



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

Ângela Paula
Martinho Tavares

**Composição terpénica e actividade antioxidante de
plantas e óleos**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**Ângela Paula
Martinho Tavares**

**Composição terpénica e actividade antioxidante de
plantas e óleos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Este trabalho prova que
“posso todas as coisas Naquele que me fortalece”

(Filipenses 4:13).

Obrigada Deus!

Dedico este trabalho à minha família (aquela onde nasci, aquela que me acolheu e aquela que construirei ao lado de quem amo) e aos amigos que, de tão especiais que são, se tornaram família!

O júri
Presidente

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Rosário Bronze
Professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
(orientadora)
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora, Sílvia M. Rocha pela paciência e compreensão mas principalmente por todos os conhecimentos e conselhos partilhados.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar por estarem sempre disponíveis para me ajudar e apoiar moralmente.

Aos meus amigos de mestrado pela amizade e disponibilidade.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo seu apoio incondicional e incansável.

Ao meu namorado que esteve sempre ao meu lado a dar motivação e sobretudo por acreditar em mim.

Aos amigos de longa data por me escutarem, aconselharem e apoiarem, em especial à Juliana.

Um agradecimento profundo e sincero a todos por me ajudarem nesta caminhada.

Palavras-chave

Eucalyptus globulus L., *Citrus limon* L., *Hypericum androsaemum* L., óleo essencial, compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅, micro-extracção em fase sólida em modo de espaço-de-cabeça (HS-SPME), cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (GC × GC-ToFMS), actividade antioxidante.

Resumo

Os efeitos benéficos para a saúde humana associados ao uso de plantas, assim como dos seus óleos essenciais ou extractos, têm sido reconhecidos desde a antiguidade. Actualmente tem-se verificado um interesse crescente em conhecer quais os compostos responsáveis por esses efeitos. O interesse pelos compostos bioactivos das plantas tem crescido devido à ideia, generalizada, de que os produtos naturais apresentam menor toxicidade e efeitos colaterais relativamente aos produtos de síntese. Estes efeitos benéficos para a saúde podem ser explicados por um ou vários constituintes das plantas, entre estes destacam-se alguns metabolitos secundários, como os compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅. A actividade antioxidante é um dos efeitos muito explorado nos estudos sobre produtos naturais, dado que actualmente se tem dado muita importância aos antioxidantes naturais presentes em fontes vegetais devido ao seu suposto papel na protecção do corpo humano contra um grande número de doenças degenerativas. Esta actividade é o resultado da presença e/ou interacção entre vários constituintes das plantas. Compostos fenólicos, carotenóides, compostos terpénicos, entre outros, podem estar na base da actividade antioxidante associada às plantas. Com vista a uma futura valorização das plantas como possíveis fontes de compostos bioactivos, neste trabalho foram utilizadas três espécies de plantas que a população portuguesa usa na medicina tradicional (*Eucalyptus globulus* L., *Citrus limon* L., *Hypericum androsaemum* L.) bem como os seus óleos essenciais, obtidos por destilação por arrastamento de vapor. Estas amostras foram avaliadas relativamente à sua composição em compostos terpénicos (C₁₀ e C₁₅) e actividade antioxidante. Para o estudo da composição terpénica das plantas secas usou-se a técnica de micro-extracção em fase sólida em modo de espaço-de-cabeça, combinada com a cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME/GC × GC-ToFMS). A fracção terpénica dos óleos também foi caracterizada por GC × GC-ToFMS e a sua actividade antioxidante foi estudada pelo método de DPPH[•].

Relativamente às plantas secas, no *E. globulus* L foram identificados 190 compostos terpénicos, no *C. limon* L. 157 e no *H. androsaemum* L. 136. Nos óleos essenciais, identificaram-se 84, 35 e 48 compostos no *E. globulus* L., *C. limon* L e *H. androsaemum* L., respectivamente. Nas plantas secas e respectivos óleos de *E. globulus* L., *C. limon* L, os compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados são o grupo maioritário, enquanto os compostos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto são predominantes no *H. androsaemum* L.. A aplicação de uma técnica de elevada sensibilidade e resolução cromatográfica possibilitou o estudo detalhado da fracção terpénica em C₁₀ e C₁₅ e a identificação de novos compostos nestas espécies: 130 e 51 novos compostos na planta seca e respectivo óleo de *E. globulus* L., 100 e 9 para o *C. limon* L. e 107 e 23 para o *H. androsaemum* L.. O óleo essencial obtido a partir de *C. limon* L. foi o que apresentou maior actividade antioxidante, avaliada através do valor de EC₅₀ (menor valor de EC₅₀, 2523 mg/L). Verificou-se, ainda, que os óleos estudados apresentaram uma cinética lenta.

Com este trabalho foi possível verificar que estas três plantas são uma fonte de compostos terpénicos, tal como os seus óleos, o que pode futuramente ser explorado em várias vertentes, nomeadamente no desenvolvimento de produtos de valor acrescentado a partir destas espécies. Também é de realçar o facto de na avaliação da actividade antioxidante se verificar que os óleos apresentaram uma cinética lenta, o que significa que têm um efeito antioxidante que se prolonga durante bastante tempo podendo ter aplicações interessantes em várias áreas.

Keywords

Eucalyptus globulus L., *Citrus limon* L., *Hypericum androsaemum* L., essential oil, terpenic compounds (C₁₀ and C₁₅), headspace solid phase microextraction (HS-SPME), comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a time-of-flight mass spectrometer (GC × GC-ToFMS), antioxidant activity.

Abstract

The benefit effects to human health associated with the use of plants as well as their essential oils or extracts, have been recognized since antiquity. Currently there has been a growing interest in knowing which compounds are responsible for these effects. The interest in bioactive compounds from plants has grown due to the idea, widespread, that natural products have lower toxicity and side effects than the products of synthesis. These beneficial effects on health could be explained by one or more constituents of plants, among them some secondary metabolites, such as terpene compounds in C₁₀ and C₁₅. The anti-oxidant activity is one of effects more explored in studies of natural products as they currently have been given much importance to the natural antioxidants present in plant sources due to his alleged role in protecting the body against a large number of degenerative diseases. This activity is the result of the presence and / or interaction between various constituents of plants. Phenolic compounds, carotenoids, terpene compounds, among others, could be the basis of anti-oxidant activity associated with plants. With a view to future recovery of the plants as possible sources of bioactive compounds, in this study it were used three plant species that the Portuguese population uses in folk medicine (*Eucalyptus globulus* L., *Citrus limon* L., *Hypericum androsaemum* L.) as well as their essential oils obtained by steam distillation. These samples were evaluated for its composition in terpenic compounds (C₁₀ and C₁₅) and anti-oxidant activity. For the study of terpene composition of dried plants the headspace solid phase microextraction, combined with comprehensive two-dimensional chromatography gas chromatography mass spectrometry time of flight (HS -SPME/GC × GC-ToFMS). The terpene fraction of the oils was also characterized by GC × GC-ToFMS and their antioxidant activity was studied by the DPPH[•] method.

For the dried plants in *E. globulus* L 190 terpenic compounds were identified 157 in *C. limon* L. and 136 in *H. androsaemum* L..In the essential oils, were identified 84, 35 and 48 compounds in *E. globulus* L., *C. limon* L and *H. androsaemum* L., respectively. In the dried plants and their essential oils of *E. globulus* L. and *C. limon* L, the C₁₀ oxygenated terpene compounds are the major group, while the C₁₅ hydrocarbon-type are predominant in *H. androsaemum* L.. The application of a technique of high sensitivity and chromatographic resolution allowed the detailed study of the terpene fraction in C₁₀ and C₁₅ and the identification of new compounds in these species: 130 and 51 new compounds in the dried plant of *E. globulus* L. and its oil, 100 and 5 in *C. limon* L.,107 and 23 for *H. androsaemum* L.. The essential oil obtained from *C. limon* L. showed the highest antioxidant activity measured by the EC₅₀ value (lower value of EC₅₀ 2523 mg / L). The oils studied also showed a slow kinetic.

With this work was verified that these three plants are a source of terpene compounds, as well their oils, which can further be exploited in several aspects, including development of product added value from these species. It is also worth noting the fact that the assessment of the anti-oxidant found that the oils showed a slow kinetic, which means they have an antioxidant effect that lasts for a long time and may have interesting applications in several areas.

Índices

Índice Geral

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas	viii
1. Introdução.....	1
1.1. As plantas como fonte de compostos terpénicos com efeitos benéficos para a saúde humana.....	3
1.2. Óleos essenciais.....	5
1.3. Preparação de óleos essenciais através de destilação por arrastamento de vapor .	5
1.4. Metodologia para a análise de compostos terpénicos em C ₁₀ e C ₁₅	6
1.4.1. Micro-extracção em fase sólida (SPME).....	6
1.4.2. Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa (GC × GC) ...	12
1.5. Avaliação da actividade antioxidante pelo método de DPPH´	14
1.6. Espécies de plantas em estudo.....	18
1.6.1. <i>Eucalyptus globulus</i> L. – Eucalipto.....	18
1.6.2. <i>Citrus limon</i> L. – Limoeiro.....	25
1.6.3. <i>Hypericum androsaemum</i> L. – Hipericão do Gerês	30
2. Objectivos	37
3. Materiais e métodos	41
3.1. Amostras.....	43
3.2. Materiais e reagentes	43
3.3. Métodos	43
3.3.1. Análise da composição terpénica em C ₁₀ e C ₁₅ das plantas secas por HS-SPME/ GC × GC-ToFMS	43
3.3.2. Obtenção dos óleos essenciais usando destilação por arrastamento de vapor	45

Índice Geral

3.3.3. Análise da composição terpénica em C ₁₀ e C ₁₅ dos óleos essenciais por GC × GC-ToFMS	46
3.3.4. Processamento dos dados GC × GC-ToFMS das plantas secas e dos respectivos óleos essenciais	46
3.4. Avaliação da actividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método de DPPH'	47
4. Resultados e discussão	49
4.1. Estudo da composição terpénica em C ₁₀ e C ₁₅ das plantas secas	51
4.2. Estudo da composição terpénica em C ₁₀ e C ₁₅ dos óleos essenciais	73
4.3. Avaliação da actividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método de DPPH'	92
5. Conclusões.....	99
6. Referências bibliográficas.....	103

Índice de Figuras

Figura 1 — Representação esquemática da unidade isoprénica e do isopreno.	4
Figura 2 — Representação esquemática de vários compostos monoterpénicos.....	4
Figura 3 — Representação esquemática de vários compostos sesquiterpénicos.....	4
Figura 4 — Representação esquemática de um dispositivo de SPME (suporte e fibra).	7
Figura 5 — Representação esquemática dos mecanismos de extracção com as secções transversais das fibras revestidas. (Adaptado de: [26])	8
Figura 6 — Representação esquemática da extracção de analitos por SPME de forma directa ou em modo espaço-de-cabeça.	8
Figura 7 — Esquema da técnica SPME (para uma amostra líquida e usando o modo espaço-de-cabeça), extracção e dessorção dos analitos. (Adaptado de: [28 e 29])	9
Figura 8 — Representação esquemática do GC × GC.	12
Figura 9 — Estrutura química do radical livre DPPH [•] . (Adaptado de: [67])	15
Figura 10 — Reacção do radical livre DPPH [•] com uma espécie dadora de hidrogénio.	16
Figura 11 — Reacção do radical livre DPPH [•] com um radical.	16
Figura 12 — Reacção do radical livre DPPH [•] com o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante.	16
Figura 13 — Mecanismo da reacção do radical livre DPPH [•] com o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante. (Adaptado de: [33]).....	17
Figura 14 — A árvore <i>Eucalyptus globulus</i> L. e as suas folhas, flores e frutos (designados por pseudocápsulas).....	18
Figura 15 — Representação esquemática do monoterpeneo 1,8-cineole.....	22
Figura 16 — A árvore <i>Citrus limon</i> L. e as suas folhas.	25
Figura 17 — Representação esquemática dos isómeros de limoneno.	29
Figura 18 — Representação esquemática do β-pineno, do linalol e do citral (<i>E</i> e <i>Z</i>), compostos presentes em quantidades consideráveis no óleo essencial das folhas de <i>C. limon</i> L.....	29
Figura 19 — A planta de <i>Hypericum androsaemum</i> L. e as suas folhas e flores.	30
Figura 20 — Representação esquemática dos sesquiterpenos que são componentes maioritários do óleo essencial de <i>H. androsaemum</i> L.....	32
Figura 21 — Representação esquemática dos componentes maioritários do óleo essencial de <i>H. androsaemum</i> L. (folhas e flores).	33
Figura 22 — Aparelho Pegasus® 4D GC × GC-ToFMS [105].	44
Figura 23 — A montagem da destilação por arrastamento de vapor usada neste trabalho. .	46
Figura 24 — Diagramas de contornos do GC × GC-ToFMS, em corrente total de iões, referentes às folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i> L. (A), <i>Citrus limon</i> L. (B) e <i>Hypericum</i>	

<i>androsaemum</i> L. (C) mostrando a distribuição de classes de compostos em diferentes regiões do espaço cromatográfico.	52
Figura 25 — Gráficos de barras referentes ao número de compostos terpénicos em C ₁₀ e C ₁₅ e à área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a.) e também em percentagem, para cada espécie de planta seca em estudo.	54
Figura 26 — Compostos terpénicos em C ₁₀ e C ₁₅ presentes nas folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i> L. (A) e <i>Citrus limon</i> L. (B) e na amostra comercial de <i>Hypericum androsaemum</i> L. (C), cuja área cromatográfica é maior que 500 x 10 ⁵ unidades arbitrárias (u.a.).....	64
Figura 27 — Compostos terpénicos em C ₁₀ e C ₁₅ presentes nas folhas da planta seca de <i>H. androsaemum</i> L. cuja área cromatográfica é maior que 100 x 10 ⁵ unidades arbitrárias (u.a).	65
Figura 28 — Diagramas de contornos do GC × GC-ToFMS em corrente total de iões referentes aos óleos essenciais de <i>Eucalyptus globulus</i> L. (A), <i>Citrus limon</i> L. (B) e <i>Hypericum androsaemum</i> L. (C), obtidos por destilação por arrastamento de vapor mostrando a distribuição de classes de compostos.....	75
Figura 29 — Gráficos de barras referentes ao número de compostos terpénicos em C ₁₀ e C ₁₅ e à área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a.) e também em percentagem, para cada um dos óleos obtidos a partir de cada espécie de planta em estudo.....	77
Figura 30 — Compostos terpénicos em C ₁₀ e em C ₁₅ presentes nos óleos essenciais, obtidos através de destilação por arrastamento de vapor, das folhas secas de <i>E. globulus</i> L. (A), das folhas frescas de <i>C. limon</i> L. (B) e da amostra comercial de <i>H. androsaemum</i> L. (C) em função da área cromatográfica expressa em unidades arbitrárias (u.a).	84
Figura 31 — Curva de calibração de DPPH [•]	93
Figura 32 — A: Comportamento cinético do ácido gálico; B: Inibição do radical livre DPPH [•] por soluções de diferentes concentrações de ácido gálico (30 min).....	94
Figura 33 — A: Comportamento cinético do óleo essencial de <i>E. globulus</i> L.; B: Inibição do radical livre DPPH [•] por soluções de diferentes concentrações de óleo essencial.	95
Figura 34 — A: Comportamento cinético do óleo essencial de <i>C. limon</i> L.; B: Inibição do radical livre DPPH [•] por soluções de diferentes concentrações de óleo essencial.	96

Índice de Tabelas

Tabela 1 — Exemplo de alguns dos revestimentos de fibras de SPME disponíveis comercialmente bem como as suas propriedades e aplicações, de acordo com as especificações do produtor.	8
Tabela 2— Métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis, métodos de análise e compostos identificados no <i>E. globulus</i> L.	20
Tabela 3 — Efeitos benéficos do <i>E. globulus</i> L.	22
Tabela 4 — Efeitos biológicos do 1,8-cineole, composto mais abundante no <i>E. globulus</i> L.	23
Tabela 5 — Valores de EC ₅₀ , actividade anti-radicalar (AE) e teor em compostos fenólicos para diferentes amostras obtidas a partir das folhas de <i>E. globulus</i> L.	23
Tabela 6 — Métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis, métodos de análise e compostos identificados no <i>C. limon</i> L.	26
Tabela 7 — Efeitos benéficos do <i>C. limon</i> L.	28
Tabela 8 — Métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis, métodos de análise e compostos identificados no <i>H. androsaemum</i> L.	31
Tabela 9 — Efeitos benéficos do <i>H. androsaemum</i> L.	34
Tabela 10 — Valores de EC ₅₀ e teor em compostos fenólicos para diferentes amostras obtidas a partir das folhas de <i>H. androsaemum</i> L.	34
Tabela 11 — Condições de análise usadas no GC × GC-ToFMS.	45
Tabela 12 — Compostos voláteis identificados por GC × GC-ToFMS nas folhas secas de <i>E. globulus</i> L., <i>C. limon</i> L. e <i>H. androsaemum</i> L. (Média da área cromatográfica obtida x 10 ⁵ , expressa em unidades arbitrárias (u.a.)).	57
Tabela 13 — Compostos terpénicos (C ₁₀ e C ₁₅) presentes nas plantas secas de <i>E. globulus</i> L., <i>C. limon</i> L. e <i>H. androsaemum</i> L.: (a) — identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS no presente trabalho; Lit. — reportados na literatura em trabalhos anteriores.	67
Tabela 14 — Compostos voláteis identificados por GC × GC-ToFMS nos óleos essenciais, obtidos por destilação por arrastamento de vapor, a partir das folhas secas de <i>E. globulus</i> L., das folhas frescas de <i>C. limon</i> L. e da amostra comercial de <i>H. androsaemum</i> L.	79
Tabela 15 — Compostos terpénicos (C ₁₀ e C ₁₅) presentes nos óleos essenciais de <i>E. globulus</i> L., <i>C. limon</i> L. e <i>H. androsaemum</i> L.: (a) — identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS no presente trabalho; Lit. — reportados na literatura em trabalhos anteriores.	88
Tabela 16 — Valores de EC ₅₀ , AE e respectiva classificação da cinética para os óleos essenciais analisados neste estudo.	97

Abreviaturas

Abreviatura	Significado em Português	Significado em Inglês
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
CAR	Carboxeno	Carboxen
CW	-	Carbowax
DVB	Divinilbenzeno	Divinylbenzene
EC	Concentração eficiente	Efficient Concentration
EI	Impacto electrónico	Electronic impact
GC	Cromatografia em fase gasosa	Gas chromatography
GC × GC	Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa	Comprehensive two-dimensional gas chromatography
GC × GC-FID	Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa com detector de ionização de chama	Comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector
GC × GC-ToFMS	Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo	Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama	Gas chromatography with a flame ionization detector
HD	Hidrodestilação	Hydrodistillation
HRGC	Cromatografia em fase gasosa de alta resolução	High-resolution gas chromatography
HS	Espaço-de-cabeça	Headspace
LLE	Extracção líquido-líquido	Liquid-liquid extraction
LMCS	Sistema criogénico longitudinalmente modulado	Longitudinally modulating cryogenic system
MS	Espectrometria de massa	Mass spectrometry
MSDE	Micro-extracção e destilação a vapor	Micro steam distillation extraction
PA	Poliacrilato	Polyacrylate
PDMS	Polidimetilsiloxano	Polydimethylsiloxane
RI	Índice de retenção	Retention index
SPE	Extracção em fase sólida	Solid phase extraction
SPME	Micro-extracção em fase sólida	Solid phase microextraction
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo	Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

1. Introdução

1. Introdução

1.1. As plantas como fonte de compostos terpénicos com efeitos benéficos para a saúde humana

Desde os tempos pré-históricos que muitas plantas têm sido usadas pelo Homem na alimentação, pois muitos dos metabolitos secundários das plantas são responsáveis pelos sabores, aromas e cores que caracterizam a variedade da dieta [1], e para o tratamento de várias doenças. Ao longo do tempo o interesse por plantas com efeitos benéficos para a saúde tem sido notório e a prova disso é que hoje em dia mais de 50 mil plantas são utilizadas com fins medicinais [2]. O interesse pelos compostos bioactivos das plantas tem crescido e muitas plantas têm sido estudadas quanto à sua composição química e aos seus efeitos benéficos para a saúde uma vez que há a ideia, generalizada, de que os produtos naturais apresentam toxicidade e efeitos colaterais menores relativamente aos produtos de síntese.

Os produtos vegetais primários referem-se aos grupos químicos hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos estando as suas funções relacionadas com a fisiologia, estrutura e genética, que têm um papel crucial no desenvolvimento das plantas. Em contraste, os metabolitos secundários normalmente ocorrem como compostos minoritários, em baixas concentrações, estando envolvidos nos mecanismos de sinalização e de defesa (relativamente a predadores e patogénicos), bem como nas funções antioxidante e bio-reguladora. Embora muitos desses metabolitos mostrem semelhanças estruturais com os produtos primários, pode-se dividir os metabolitos secundários nos seguintes principais grupos químicos: terpenóides, compostos fenólicos, alcalóides, aminoácidos raros, aminas vegetais e glicosídeos [3].

Os compostos terpénicos formam uma família numerosa e estruturalmente variada de produtos naturais provenientes de unidades de isopreno (C_5) cuja representação se encontra na figura 1. As estruturas típicas contêm esqueletos de carbono representados pela fórmula geral $(C_5)_n$, e são classificadas como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) [4].

1. Introdução

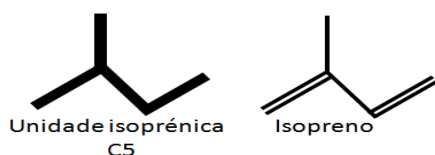


Figura 1 — Representação esquemática da unidade isoprénica e do isopreno.

Quimicamente os compostos terpénicos apresentam uma grande variedade estrutural e são classificados em terpenos e terpenóides. Os terpenos são hidrocarbonetos pelo que na sua constituição apresentam apenas carbono e hidrogénio (como é o caso do limoneno, representado na figura 2). Os terpenóides, além de carbono e hidrogénio, possuem na sua estrutura oxigénio, organizados em diferentes grupos funcionais (álcool, ácido carboxílico, éter, aldeído e cetona, entre outros) [4] encontrando-se alguns exemplos representados nas figuras 2 e 3 que se seguem.

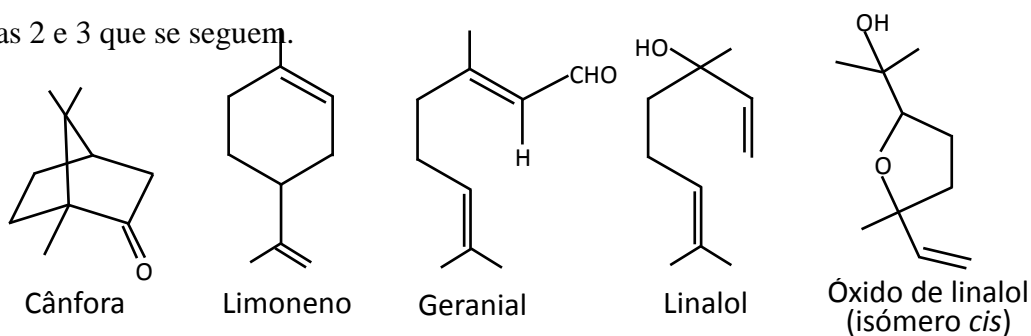


Figura 2 — Representação esquemática de vários compostos monoterpénicos.

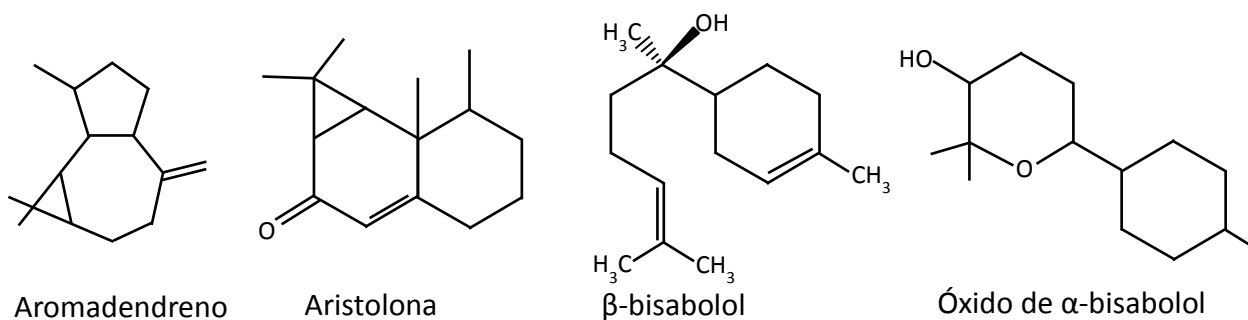


Figura 3 — Representação esquemática de vários compostos sesquiterpénicos.

1. Introdução

1.2. Óleos essenciais

Mais de 2000 espécies de plantas, de 60 famílias diferentes, permitem obter óleos essenciais mas apenas cerca de 100 espécies são a base para a produção de óleos essenciais de importância económica em todo o mundo [5]. Podem-se obter óleos essenciais a partir de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules das plantas, normalmente por hidrodestilação, também designada por destilação por arrastamento de vapor, uma técnica desenvolvida pela primeira vez na Idade Média pelos árabes [6]. Actualmente existem outros métodos de obtenção de óleos essenciais, designadamente a extracção com fluido supercrítico.

Os óleos essenciais são caracterizados por um odor intenso e possuem na sua composição compostos naturais, complexos, voláteis – os compostos terpénicos – que são metabolitos secundários das plantas [3]. Sendo misturas naturais muito complexas os óleos essenciais, analisados com recurso à cromatografia unidimensional, podem conter cerca de 20-60 componentes em concentrações muito diferentes. Normalmente um óleo essencial é caracterizado por dois ou três componentes principais, em concentrações bastante altas, em comparação com outros componentes, que por vezes estão presentes em quantidades vestigiais. Geralmente, esses componentes principais determinam as propriedades biológicas de determinado óleo essencial [6].

Os monoterpenos são as moléculas mais representativas de alguns óleos essenciais (às vezes constituindo cerca de 90 %) [6]. Os sesquiterpenos são uma grande família de produtos naturais encontrados não só em plantas mas também em microrganismos e organismos marinhos e por vezes, dependendo da sua concentração, apresentam citotoxicidade. Nas plantas os sesquiterpenos desempenham importantes papéis ecológicos nas interacções com os insectos e os microrganismos pois actuam como atractivos ou repelentes. Além disso estes compostos são os principais componentes de muitos óleos essenciais, que são importantes comercialmente para as indústrias de aromas e fragrâncias [7].

1.3. Preparação de óleos essenciais através de destilação por arrastamento de vapor

A destilação por arrastamento de vapor tem sido muito utilizada como método de obtenção de óleos essenciais a partir de plantas e são disso exemplo os trabalhos desenvolvidos por Zrira *et al.* (2004) [8] que procederam à determinação da composição

1. Introdução

química dos óleos essenciais das folhas de nove espécies de eucalipto existentes em Marrocos Topal *et al.* (2008) [9] que estudaram a composição química de óleos de nove espécies de plantas; Bendaoud *et al.* (2009) [10] que analisaram o óleo essencial das folhas de *Eucalyptus radiata*; Barra, Coroneo *et al.* (2010) [11] estudaram o óleo essencial das partes aéreas de *Eucalyptus camaldulensis*; Iqbal *et al.* (2011) [12] estudaram o óleo essencial de *Eucalyptus polybractea*; Silvestre *et al.* (1997) [13] usaram folhas frescas de *Eucalyptus globulus* L. para obter o seu óleo essencial; Della Porta *et al.* (1999) [14] obtiveram o óleo essencial de *E. globulus* L.; Cimanga *et al.* (2002) [15] obtiveram óleo essencial de folhas frescas de *E. globulus* L.; Vekiari *et al.* (2002) [16] obtiveram óleo essencial das folhas de *Citrus limon* L.; Kirbalsar *et al.* (2004) [17] estudaram o óleo essencial das folhas de *Citrus limon*; Baik *et al.* (2008) [18] cuja composição química de 14 tipos de óleos cítricos obtidos a partir da casca dos frutos foi analisada; Smelcerovic *et al.* (2007) [19] analisaram os óleos essenciais das partes aéreas de nove espécies de *Hypericum*; Guedes, Amorim *et al.* (2003) [20] efectuaram hidrodestilação das folhas frescas de *Hypericum androsaemum* L.; Guedes, Amorim *et al.* (2004) [21] efectuaram hidrodestilação das folhas frescas de *Hypericum androsaemum* L.; Morteza-Semnani e Saeedi (2005) [22] procederam à hidrodestilação de folhas secas de *Hypericum androsaemum* L..

1.4. Metodologia para a análise de compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅

1.4.1. Micro-extracção em fase sólida (SPME)

A análise de compostos voláteis ou semi-voláteis orgânicos geralmente começa com uma fase de extracção, por exemplo, usando extracção líquido-líquido (LLE), extracção em fase sólida (SPE) ou micro-extracção em fase sólida (SPME). LLE e SPE envolvem o uso de solventes orgânicos, sendo assim, consideradas técnicas não amigas do ambiente. Nas últimas décadas têm sido efectuados vários estudos no sentido de desenvolver técnicas de extracção versáteis e que não envolvam o uso de solventes.

A micro-extracção em fase sólida (SPME) é uma técnica de amostragem/extracção e concentração desenvolvida nos anos 90, na Universidade de Waterloo (Ontário, Canadá), por Janusz Pawliszyn *et al.* [23]. Esta técnica é actualmente amplamente aceite em inúmeras áreas, o que se reflecte em várias aplicações laboratoriais e no aumento do número de novas publicações científicas [24]. A SPME foi introduzida para analisar

1. Introdução

compostos relativamente voláteis na área do ambiente (poluentes orgânicos em águas [23]), mas, ao longo do tempo, o seu uso foi estendido para a análise de uma grande variedade de matrizes (gasosas, líquidas e sólidas) e uma ampla variedade de analitos [24]. Os dispositivos usados na aplicação desta técnica encontram-se descritos na figura 4 que se segue.

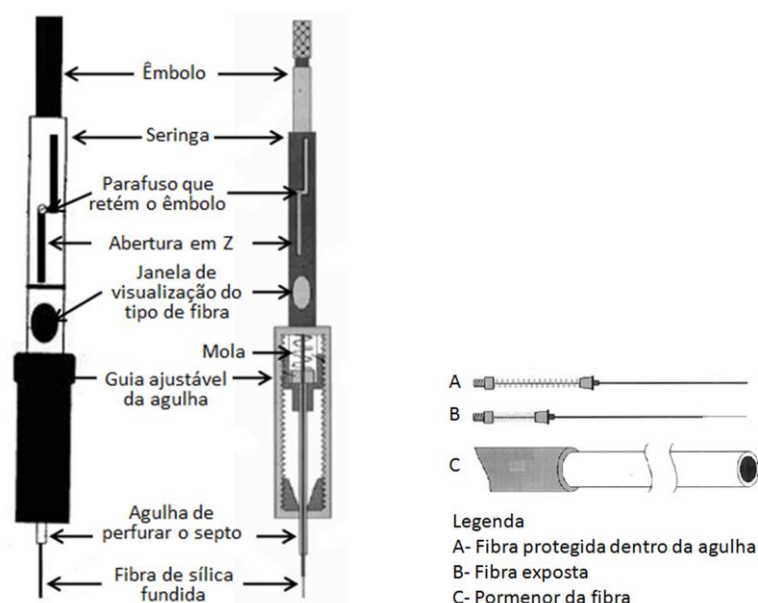


Figura 4 — Representação esquemática de um dispositivo de SPME (suporte e fibra).
(Adaptado de: [25])

Uma fibra de sílica fundida, revestida por um polímero (fase estacionária), está ligada a um êmbolo em aço inoxidável instalado num suporte parecido com uma seringa. O êmbolo move a fibra de sílica fundida para dentro e fora de uma agulha oca. A fibra é recolhida dentro da agulha que posteriormente irá atravessar o septo que sela o frasco da amostra.

Revestimento da fibra (fase estacionária)

O revestimento da fibra pode ter diferentes modos de extracção (figura 5), composições, polaridades e espessuras de filme variadas. Comercialmente existem vários tipos disponíveis, tal como se pode observar na tabela 1. Tendo em conta o tipo de compostos que se pretende analisar, bem como as condições experimentais, escolhe-se o tipo de revestimento mais adequado.

1. Introdução

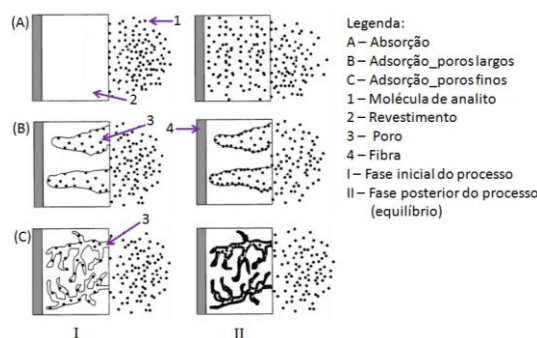


Figura 5 — Representação esquemática dos mecanismos de extracção com as secções transversais das fibras revestidas. (Adaptado de: [26])

Tabela 1 — Exemplo de alguns dos revestimentos de fibras de SPME disponíveis comercialmente bem como as suas propriedades e aplicações, de acordo com as especificações do produtor.

Fase estacionária	Tipo	Espessura do filme (μm)	Modo de extracção	Aplicações
PDMS	Apolar	100 30 7	Absorção	Compostos orgânicos apolares (tais como compostos orgânicos voláteis)
PA	Polar	85	Absorção	Compostos orgânicos polares
CW/DVB	Polar	65	Mista	Compostos orgânicos polares
PDMS/DVB	Bi-polar	60 65	Mista	Hidrocarbonetos aromáticos; aminas aromáticas; compostos orgânicos voláteis
CAR/PDMS	Bi-polar	75	Mista	Compostos de baixo peso molecular e gases
DVB/CAR/PDMS	Bi-polar	30 50	Mista	Compostos voláteis e semi-voláteis (tais como mono e sesquiterpenos)

PDMS-Polidimetilsiloxano; PA-Poliacrilato; DVB-Divinilbenzeno; CW-Carbowax; CAR-Carboxeno
Adaptado de [24 e 27].

Aplicação da técnica de micro-extracção em fase sólida

A SPME pode ser aplicada para extrair os analitos de forma directa ou em modo espaço-de-cabeça. Na extracção directa a fibra é directamente imersa na amostra de líquido ou gás enquanto na extracção em modo espaço-de-cabeça a fibra é exposta ao espaço-de-cabeça (espaço livre acima da amostra) de uma amostra líquida ou sólida, tal como mostra a figura 6.

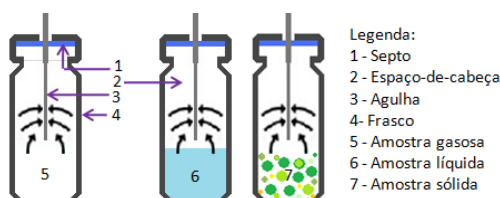


Figura 6 — Representação esquemática da extracção de analitos por SPME de forma directa ou em modo espaço-de-cabeça.

1. Introdução

A fibra que está recolhida dentro da agulha, que irá atravessar o septo que sela o frasco da amostra, é exposta à amostra ou ao seu espaço-de-cabeça quando o êmbolo é descido permitindo que os analitos fiquem sorvidos ao revestimento polimérico da fibra. Após o equilíbrio de sorção ser atingido (geralmente de 2 a 30 minutos), ou quando se pretender, a fibra é recolhida para dentro da agulha e esta é depois retirada do frasco da amostra. Por fim, a agulha é introduzida no septo do injetor do cromatógrafo onde os analitos sorvidos são termicamente dessorvidos e passam para a coluna de GC. A técnica de micro-extracção em fase sólida, para uma amostra líquida e usando o modo espaço-de-cabeça, é mostrada na seguinte figura (figura 7).



Figura 7 — Esquema da técnica SPME (para uma amostra líquida e usando o modo espaço-de-cabeça), extração e dessorção dos analitos. (Adaptado de: [28 e 29])

Um dos factores a ter em consideração na escolha de uma técnica de extração é a volatilidade dos analitos alvo e assim os analitos alta e moderadamente voláteis são de preferência extraídos no espaço-de-cabeça.

Parâmetros experimentais que influenciam a eficiência da extração na técnica de SPME

Os resultados que se obtêm pela aplicação da SPME são influenciados por diversos factores. A quantidade de analito extraída pela fibra depende da polaridade e da espessura da fase estacionária, do tempo de extração, da temperatura usada, das características da amostra (tamanho, composição e concentração dos analitos na amostra).

1. Introdução

Em trabalhos anteriores [27, 30] concluiu-se que o melhor revestimento da fibra de SPME para os compostos terpénicos (C_{10} e C_{15}) é o DVB/CAR/PDMS, pois permitiu identificar um número maior de compostos e numa área cromatográfica maior, apresentando, portanto, uma maior eficiência extractiva. Relativamente ao tempo de extracção sabe-se que quanto maior for o período de extracção, isto é, o contacto da fibra com a amostra ou com o espaço-de-cabeça, maior será a quantidade de compostos extraídos (até se atingir o equilíbrio dos analitos entre a amostra, o espaço-de-cabeça e o revestimento da fibra) [31], da mesma forma que o aumento da temperatura, ainda que ligeiramente, aumenta a absorção dos compostos à fase estacionária [32]. O volume do frasco onde se coloca a amostra e o próprio volume de amostra que se usa para a SPME também afecta os resultados. Ao proceder ao trabalho experimental, nomeadamente na realização de réplicas, deve-se usar o mesmo volume de amostra no mesmo tipo de frascos (mesmo volume e formato) pois isto determina o espaço-de-cabeça e consequentemente a cinética de extracção [31]. A razão entre o volume de gás e o volume de amostra, ou seja, razão volume de espaço-de-cabeça/volume da amostra (β), pressupõe que tem de haver espaço suficiente para que os compostos se possam volatilizar da amostra para o espaço-de-cabeça, de forma a atingir o equilíbrio entre as duas fases, de modo a que haja uma boa sorção dos compostos à fibra [31]. Outro factor a ter em conta diz respeito às características da amostra, no caso de amostras sólidas como é o caso de plantas secas em estudo no presente trabalho, os pedaços que constituem a amostra devem ser do mesmo tamanho.

Vantagens da técnica de SPME

A SPME apresenta inúmeras vantagens em relação a outras técnicas. Com esta técnica o uso de solventes orgânicos para a extracção dos analitos é completamente eliminado; não se requer a remoção completa do analito da matriz a analisar; o tempo de extracção pode ser reduzido a poucos minutos uma vez que a geometria da superfície cilíndrica das fibras é muito bem definida o que permite o acesso fácil dos analitos à sua superfície e que, consequentemente torna a extracção e a dessorção eficientes. Além disso, as pequenas dimensões da fibra são convenientes para proceder à injeção no injector do cromatógrafo [23].

1. Introdução

Com os métodos convencionais (por exemplo destilação por arrastamento de vapor ou extracção com solvente) obtêm-se extractos, incluindo os de plantas, com uma composição de compostos voláteis que caracteriza uma matriz líquida e que muitas vezes não é a responsável pelo cheiro/aroma que é percebido pelo sistema olfactivo humano. As substâncias são percebidas pelo sistema olfactivo humano se estiverem em concentrações acima do seu limiar de detecção sensorial, estas substâncias encontram-se no espaço-de-cabeça que pode ser analisado recorrendo à SPME. Outra desvantagem dos métodos convencionais, e que é ultrapassada pela SPME, é que os extractos que se obtêm devem ser concentrados antes de se proceder à análise o que se traduz na perda de compostos voláteis de baixo ponto de ebulição [32].

Verifica-se que as fibras de SPME apresentam várias vantagens, sendo que o facto de poderem ser reutilizadas diversas vezes é uma das mais importantes. Contudo a reutilização das fibras, de forma a manter uma elevada eficiência extractiva nas várias utilizações, depende do tipo de aplicação a que estas são sujeitas, nomeadamente o tipo de matriz da amostra, as condições experimentais e os cuidados que se têm durante o manuseamento [33].

Aplicações da técnica de SPME

Tem-se aplicado esta metodologia no estudo da composição de frutos (maçã [34 e 35], ameixa [36] e uvas [37 e 38]), plantas (Lúcia-lima [39], coentro [40], erva-mate [41], camomila [33], entre outras), bebidas (águas [42], vinho [38] e outras bebidas alcoólicas [43], sumos de fruta [44 e 45] e leite [46]), sal [47], queijo [48], entre outras amostras.

Em 2010 Santos [27] procedeu ao estudo da composição terpénica de 25 plantas, incluindo aquelas que são alvo de estudo no presente trabalho: *Eucalyptus globulus* L., *Citrus limon* L. e *Hypericum androsaemum* L. usando SPME. No ano seguinte Tyagi e Malik [49] estudaram os vapores do óleo de *E. globulus* L. usando a mesma técnica. Já em 2007 Flamini *et al.* [50] e em 2008 Fuselli *et al.* [51] tinham usado esta técnica para estudar o *C. limon* L., os primeiros estudaram a emissão de compostos voláteis por parte da planta viva de *C. limon* L. enquanto os segundos estudaram a composição química de óleos essenciais comerciais, obtidos a partir da casca do fruto de *C. limon* L..

1. Introdução

1.4.2. Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa (GC × GC)

A cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa é baseada na separação, em fase gasosa, de analitos em duas colunas capilares com diferentes fases estacionárias, por exemplo uma apolar e outra polar. A fase estacionária da coluna principal (primeira dimensão, ¹D) é geralmente mais longa, tem um diâmetro maior e uma espessura mais grossa do que a fase estacionária da coluna secundária (segunda dimensão, ²D) [52]. Os efluentes da primeira coluna são transferidos para a segunda coluna através de um dispositivo de modulação, como se verifica pela figura 8.

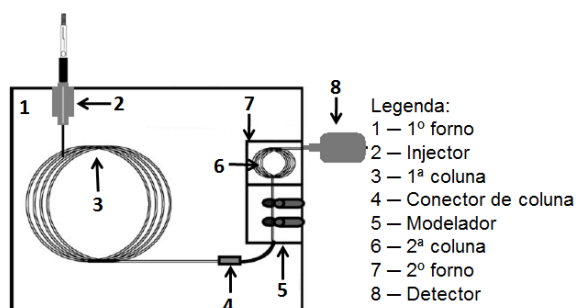


Figura 8 — Representação esquemática do GC × GC.

De acordo com seu princípio operacional os moduladores podem ser classificados em diferentes tipos. Uma das formas de efectuar a modulação é através de moduladores criogénicos de jactos frios. Nestes moduladores, o resfriamento é feito através de jactos de CO₂ ou de N₂ líquidos directamente lançados sobre a coluna. O modelador criogénico corta pequenas (alguns segundos) porções da substância eluída pela primeira coluna, isto através de criofocação, e re-injecta-a para a segunda coluna. Cada pico da primeira dimensão é modulado diversas vezes permitindo que a separação da primeira dimensão se mantenha. A segunda coluna é muito curta e estreita e, consequentemente, cada porção modulada é instantaneamente separada antes do início da modulação seguinte. Desta forma, os compostos da primeira coluna que se encontravam co-eluídos sofrem nova separação na segunda coluna [53]. O processo de modulação faz com que as bandas cromatográficas em sistemas GC × GC sejam 10 a 50 vezes mais estreitas que em 1D GC, resultando em picos modulados com largura de base entre 50 a 500 ms, exigindo detectores com resposta rápida e com pequenos volumes internos [38]. A espectrometria de massa de tempo de voo (ToFMS, Time of Flight Mass Spectrometry) permite a recolha de até 500 espectros de massa por segundo. Além disso, dado o elevado número de espectros de massa por pico,

1. Introdução

torna-se possível a desconvolução espectral de picos que coeluem na 1D e na 2D, o que aumenta a capacidade de separação.

No processamento e interpretação dos diagramas de contornos obtidos são necessários algoritmos para o reconhecimento dos picos, desconvolução espectral e comparação com a biblioteca de espectros de massa, o que torna a análise complexa e demorada. Tal como em 1D GC, os diagramas de contornos obtidos em GC \times GC contêm informações qualitativas e quantitativas sobre a composição da amostra.

Para proceder à identificação de analitos em GC \times GC procede-se ao uso de índices de retenção de Kovats ou suas variantes (por exemplo índices de Kratz ou van den Dool em separações usando programação linear de temperatura). Em 1D GC esses índices são bem estabelecidos e para os calcular procede-se à injeção de uma série homóloga de alcanos (entre C₈-C₂₀). Em adição aos dados de retenção, os diagramas de GC \times GC têm uma característica única sob o aspecto qualitativo, ausente na 1D GC, os cromatogramas são estruturados: os picos de substâncias relacionadas estruturalmente – séries homólogas, isómeros de cadeia ou de posição – aparecem agrupados em regiões claramente definidas do diagrama GC \times GC. Assim, os picos dos hidrocarbonetos com mesmo número de átomos de carbono agrupam-se sobre a superfície $^1t_R \times ^2t_R$, correspondentes a analitos com estruturas similares. Os hidrocarbonetos com mais e menos átomos de carbono agrupam-se da mesma forma. Dada a enorme capacidade de resolução de GC \times GC, o número de picos detectáveis tende a ser muito maior do que em 1D GC. A possibilidade de definição de espaços cromatográficos em função da estrutura molecular (cromatograma estruturado) apresenta-se como uma vantagem desta técnica, especialmente no estudo de amostras complexas, contendo inúmeros analitos para os quais nem sempre estão disponíveis comercialmente padrões.

A cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa (GC \times GC) foi introduzida em 1991, e rapidamente se tornou uma técnica amplamente aplicável na caracterização e análise de uma grande variedade de amostras complexas. O poder de separação em GC \times GC tem sido demonstrado em diferentes áreas. As suas aplicações para amostras petroquímicas e para a caracterização de óleos essenciais são especialmente ilustrativas do seu potencial, dada a complexidade dessas amostras e a relevância dos problemas analíticos a elas associadas. As amostras de óleos essenciais são misturas extremamente complexas, sendo que a detecção, identificação e quantificação dos

1. Introdução

constituintes são feitas, maioritariamente, por cromatografia unidimensional. Dada a presença de componentes-chave, que por vezes se encontram em concentrações extremamente baixas, que não são detectados ou então coeluem com compostos maioritários, a melhoria da detectabilidade e da separação proporcionada pelo GC \times GC é especialmente útil [25]. Em 2000 Dimandja *et al.* [54] usaram o GC \times GC-FID para análises de óleos essenciais de duas espécies de hortelã (*Mentha piperita* e *M. spicata*). Em comparação com o GC-MS o número de compostos detectáveis aumentou consideravelmente (para *M. piperita* passou de 30 para 89). No ano de 2001 Shellie *et al.* [55] estudaram o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* através de enantio-GC \times GC. Em 2002 Shellie *et al.* [56] caracterizaram óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia*, *L. hybridia* e *L. latifolia*) usando GC \times GC-FID. Di *et al.* (2004) [57] procederam à caracterização química dos óleos voláteis de misturas complexas de ervas (*Panax quinquefolius*, *Radix angelicae sinensis*, *R. astragali* e *R. rehmanniae preparata*) através de HS-SPME/GC \times GC-FID. A composição volátil de *Rosa damascena* Mill foi determinada por Özel *et al.* no ano de 2006 [58]. Em 2005 Mondello *et al.* [59] estudaram o óleo essencial extraído da casca do limão usando GC \times GC-FID e em 2008 a composição do óleo essencial de *Eucalyptus* foi estudada por von Mühlen *et al.* [60] usando GC \times GC-ToFMS.

1.5. Avaliação da actividade antioxidante pelo método de DPPH[•]

Segundo Rajalakshmi e Narasimhsan (1996) [61] desde os anos quarenta do século vinte que se usam antioxidantes. Nessa altura usavam-se substâncias naturais como antioxidantes para prolongar o tempo de prateleira de produtos alimentares. Com o tempo estas substâncias naturais foram sendo substituídas por compostos sintéticos que apresentavam melhor actividade antioxidante e cuja disponibilidade era mais fácil. No entanto a preocupação relativa à segurança dos antioxidantes sintéticos tem feito com que estes tenham perdido interesse, tanto por parte dos produtores alimentares como por parte dos consumidores, a favor dos produtos naturais. Da Porto *et al.* (2000) [62] relatam que “os antioxidantes naturais presentes nos alimentos vegetais recentemente atraíram atenção considerável devido ao seu suposto papel na protecção do corpo humano contra um grande número de doenças degenerativas” e por desempenharem um papel importante na prevenção ou redução da auto-oxidação têm sido também muito utilizados como aditivos

1. Introdução

alimentares. A atenção da qual os antioxidantes têm sido alvo pode ser verificada através dos inúmeros artigos científicos que têm sido publicados e das diversas patentes que foram concedidas, tanto para a aplicação de antioxidantes como para a síntese e descoberta de novos antioxidantes [62]. Tendo em conta o interesse demonstrado por este tipo de compostos é relevante estudar os óleos essenciais obtidos a partir das espécies de plantas em estudo quanto ao seu potencial antioxidante.

Os compostos fenólicos resultam do metabolismo secundário das plantas sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução [63]. Dos vários efeitos biológicos relatados na literatura inclui-se a actividade antioxidante [64]. Segundo Rice-Evans *et al.* (1995) [65] a actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se sobretudo às suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes redutores e doadores de hidrogénio. A capacidade de compostos fenólicos para eliminar os radicais livres deve-se ainda aos electrões π deslocalizados, característicos dos anéis de benzeno. Existe uma grande variedade de fenóis destacando-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os fenóis simples, as cumarinas, os taninos, as ligninas e os tocoferóis [66].

O método de DPPH $^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um dos mais conhecidos e frequentemente empregado para avaliar o comportamento antioxidante. O DPPH $^{\bullet}$ é um radical livre, estável por causa da deslocalização de electrões ao longo da molécula. A deslocalização provoca uma cor violeta com absorção máxima a cerca de 515 nm (figura 9).

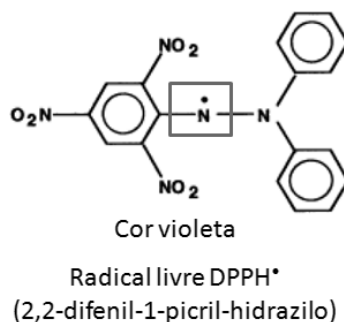


Figura 9 — Estrutura química do radical livre DPPH $^{\bullet}$. (Adaptado de: [67])

Quando uma solução de DPPH $^{\bullet}$ é misturada com um substrato que pode doar um átomo de hidrogénio (A-H), uma forma estável, não radicalar de DPPH, é obtida provocando a mudança simultânea da cor violeta para amarela (devido ao grupo picril ainda presente), como esquematizado na figura que se segue.

1. Introdução

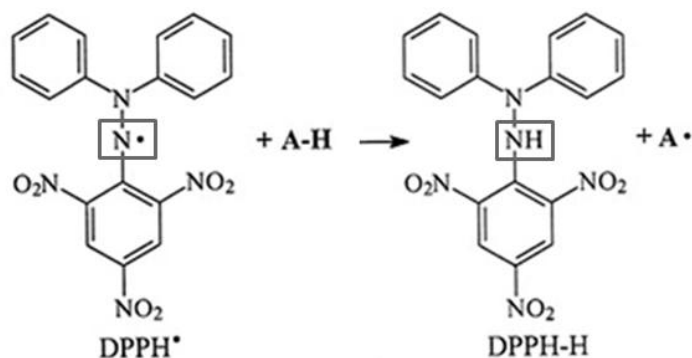


Figura 10 — Reacção do radical livre DPPH• com uma espécie dadora de hidrogénio.

(Adaptado de: [33])

A mesma perda de cor é observada quando uma solução de DPPH• é misturada com um radical livre (R•) (figura 11).

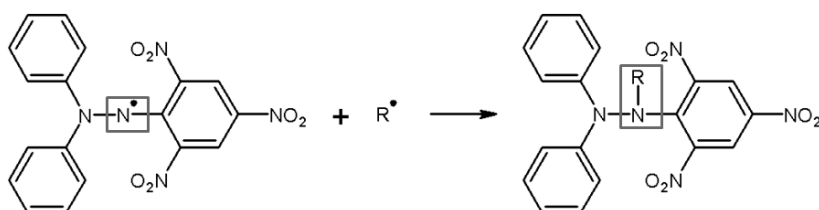


Figura 11 — Reacção do radical livre DPPH• com um radical.

Os substratos que podem doar um átomo de hidrogénio designam-se antioxidantes. Na maioria dos casos o grupo funcional que cede o protão ao radical DPPH• é o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante (figura 12).

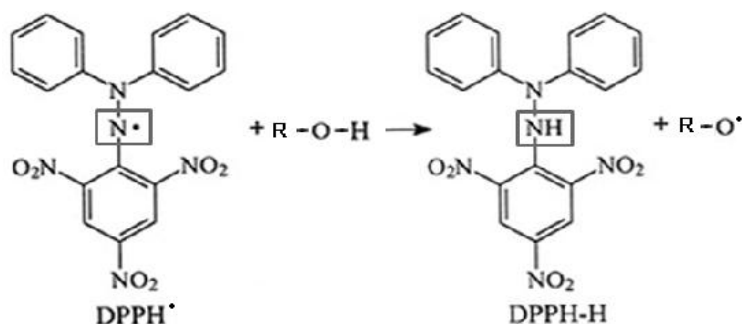


Figura 12 — Reacção do radical livre DPPH• com o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante.

Em termos reaccionais temos que o átomo de azoto do DPPH•, que contém o electrão desemparelhado, ataca o hidrogénio do grupo hidroxilo (-OH) captando para si um protão e um electrão da ligação O-H havendo então a formação de uma nova ligação entre o azoto e o átomo capturado. O oxigénio do grupo hidroxilo do antioxidante fica então com o electrão desemparelhado (figura 13) o que permite a ocorrência de rearranjos (formação de duplas ligações no oxigénio ou formação de estruturas de ressonância).

1. Introdução

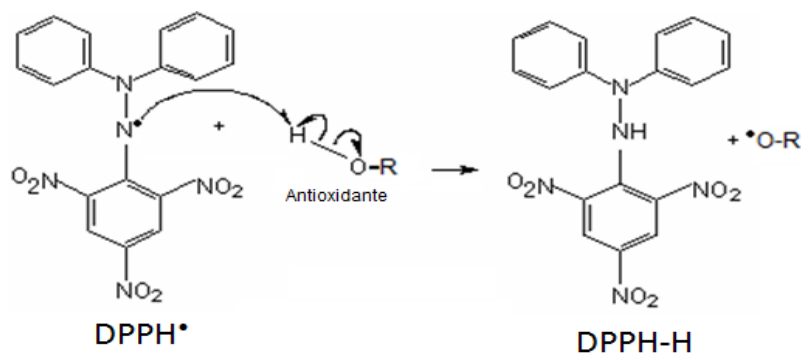


Figura 13 — Mecanismo da reacção do radical livre DPPH• com o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante. (Adaptado de: [33])

Através do método de DPPH• consegue-se estudar a actividade antioxidante de várias amostras. Para tal procede-se à adição de uma determinada quantidade de amostra à solução de DPPH• em metanol o que provoca variações nas absorvâncias do meio reaccional que podem ser quantificadas. Isto é possível porque com a redução do radical DPPH• a DPPH-H a absorvância diminui até atingir um valor constante, ou seja, até que a reacção atinge o equilíbrio. Quanto maior for a diminuição da absorvância, menor será a percentagem de DPPH• restante no meio e maior será o poder antioxidante da amostra em estudo.

A partir das variações das absorvâncias do meio reaccional determina-se a percentagem de DPPH• remanescente (DPPH_{REM}) no meio reaccional e ao mesmo tempo a quantidade de DPPH• consumida pelos antioxidantes presentes na amostra em estudo. Para tal, usa-se a seguinte equação:

$$\% \text{ DPPH}^*_{\text{REM}} = [\text{DPPH}^*]_{T=t} / [\text{DPPH}^*]_{T=0} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

onde $[\text{DPPH}^*]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH• no meio, após a reacção com o extracto e $[\text{DPPH}^*]_{T=0}$ é a concentração inicial da solução de DPPH• [33].

A quantidade de antioxidante necessária para fazer diminuir a concentração inicial de DPPH• em 50 % é denominada concentração eficiente (EC₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH• por uma determinada amostra, menor será o seu EC₅₀ e maior a sua actividade antioxidante [33].

1. Introdução

1.6. Espécies de plantas em estudo

A escolha das espécies de plantas a usar neste trabalho resulta da continuação de um trabalho [27] onde foram estudadas 25 espécies que normalmente são utilizadas na medicina tradicional pela população portuguesa. Este estudo incidiu na composição em compostos terpénicos (C_{10} e C_{15}) das plantas secas e respectivas infusões bem como na actividade antioxidante das infusões preparadas. De acordo com os seus resultados foram seleccionadas três espécies de plantas: *Eucalyptus globulus* L., *Citrus limon* L. e *Hypericum androsaemum* L.. Estas espécies mostraram ter na sua composição compostos terpénicos (C_{10} e C_{15}) em quantidades consideráveis pelo que seriam uma boa fonte de óleos ricos em compostos deste tipo com futuras aplicações bastante interessantes.

1.6.1. *Eucalyptus globulus* L. – Eucalipto

O género *Eucalyptus* compreende numerosas espécies (cerca de 600). O *Eucalyptus globulus* L. pertence à família Myrtaceae. O *Eucalyptus globulus* L., vulgarmente conhecido por eucalipto, é nativo da Austrália (principalmente a província de Victoria) e da Tasmânia. O eucalipto é uma árvore de 30-35 m, até 100 m no seu ambiente natural. O tronco tem uma casca que na base é áspera e escura, e depois é lisa, cinza e que se esfolia em tiras muito macias e perfumadas. As folhas de eucalipto são persistentes, coriáceas, glabras e dependendo da idade dos ramos são diferentes: ramos jovens têm folhas largas, curtas, opostas, sésseis, ovais, brancas e azul-cerosas, com uma lâmina real com nervuras; os ramos mais velhos têm folhas aromáticas, falciformes, de 12 a 30 cm, estreitas, pontiagudas, espessas, de cor verde-escuro, pouco pecioladas, alternadas e penduradas verticalmente. As flores nascem nas axilas das folhas e são brancas [68].



Figura 14 — A árvore *Eucalyptus globulus* L. e as suas folhas, flores e frutos (designados por pseudocápsulas).

1. Introdução

Em Portugal existe o *E. globulus* L. e estas árvores ocupam 20 % da área florestal. A sua importância económica deve-se principalmente devido à qualidade das suas fibras de celulose, que são usadas pelas indústrias de celulose [13].

Na medicina popular a infusão das folhas do *E. globulus* L. é usada externamente como analgésico, anti-séptico e anti-reumático [69]. A inalação dos vapores libertados é feita no tratamento de asma, gripe, resfriados, febre, tosse, catarro e dor de garganta.

Na tabela 2 pode-se ver a composição terpénica das folhas de *E. globulus* L. ou do óleo essencial delas extraído e a sua caracterização por diferentes métodos. Relativamente à composição em compostos terpénicos C₁₀ e C₁₅ das folhas secas de *E. globulus* L. foi verificado que os compostos maioritários foram o isómero do *allo*-aromadendreno, o 1,8-cineole, o limoneno, o α -pineno, o aromadendreno e o *p*-cimeno [27]. No que diz respeito a óleos essenciais sabe-se que são misturas naturais muito complexas com cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo que normalmente são caracterizados por dois ou três componentes principais, em concentrações bastante altas, em comparação com outros componentes, que por vezes estão presentes em quantidades vestigiais [6]. Segundo Maciel *et al.* (2010) [70] o óleo essencial das folhas de *E. globulus* L. é constituído por 1,8-cineole (também conhecido por eucaliptol) (83,89 %), limoneno (8,16 %), α -pineno (4,15 %) e *o*-cimeno (2,93%). Miyamoto *et al.* (2009) [71] verificaram a presença de 1,8-cineole (49,05 %), α -pineno (8,89 %), globulol (6,95 %), aromadendreno (2,33 %), α -terpineol (2,04 %), viridiflorol (1,78 %), β -pineno (1,50 %), γ -cadineno (1,45 %), espatulenol (1,42 %), *trans*- β -elemenona (1,23 %), α -eudesmol (1,12 %) e óxido de cariofileno (1,10 %), entre outros (presentes em quantidades menores). Por sua vez Vilela *et al.* (2009) [72] identificaram, no óleo essencial obtido por hidrodestilação, e usando GC-MS, 1,8-cineole (89,95 %), tricicleno (2,95 %), β -pineno (1,64 %), *o*-cimeno (0,88 %), terpin-4-ol (0,72 %), α -terpineol (0,62 %), mirceno (0,49 %), terpinoleno (0,38 %), isopulegol (0,36 %), *trans*-pinocarveol (0,30 %), γ -terpineno (0,25 %), *neo*-isopulegol (0,18 %), α -fencheno (0,17 %), citronelal (0,16 %), *exo*-fenchol (0,13 %) e 1,4-cineole (0,07 %). Nos três trabalhos referidos verifica-se que o componente principal do óleo essencial de *E. globulus* L. é o 1,8-cineole.

1. Introdução

Tabela 2— Métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis, métodos de análise e compostos identificados no *E. globulus* L.
() — quantidade de composto expressa em termos percentuais. Compostos ordenados por ordem decrescente de quantidade.

Objecto de estudo	Método de extracção do óleo	Método de análise	Compostos terpénicos identificados	Ref.
Folhas secas	-	HS-SPME/GC-qMS	<i>allo</i> -aromadendreno (isómero) (29,44), 1,8-cineole (28,58), limoneno (9,99), α -pineno (7,49), aromadendreno (5,36), <i>p</i> -cimeneno (3,62), calareno (isómero) (1,49), verbenona (1,11), ledeno (1,01), isoledeño (0,95), mirceno (0,87), cimeneno (0,76), β -selineno (0,71), <i>p</i> -menta-1(7), 8-dien-2-ol (isómero) (0,60), borneol (0,60), epiglobulol (0,55), pulegona (0,50), dihidroaromadendreno (0,46), α -selineno (0,44), pinocarveol (0,42), γ -gurjuneno (0,35), α -copaeno (0,34), pinocarvona (0,32), <i>p</i> -menta-1(7), 8-dien-2-ol (isómero) (0,29), α -gurjuneno (0,27), viridiflorol (0,24), <i>allo</i> -aromadendreno (isómero) (0,19), menta-1,4,8-trieno (0,19), calameneno (isómero) (0,19), carvona (0,18), α -amorfeno (0,15), γ -terpineno (0,15), β -pineno (0,12), valenceno (0,10), palustrol (0,10), β -cariofileno (0,09), β -malieno (0,09), mentofurano (0,08), ledol (0,08), α -humuleno (0,07), <i>p</i> -2,8-mentadieno-1-ol (isómero) (0,06), geranial (0,06), espatulenol (0,06), carveol (isómero) (0,05), piperitona (0,04), geraniol (0,03), β -sesquifelandreno (0,03), <i>allo</i> -ocimeno (0,03), timol (0,02), citranelol (0,02)	[27]
Óleo essencial das folhas	Hidrodestilação	GC-MS	1,8-cineole (49,05), α -pineno (8,89), globulol (6,95), aromadendreno (2,33), α -terpineol (2,04), viridiflorol (1,78), β -pineno (1,50), γ -cadineno (1,45), espatulenol (1,42), <i>trans</i> - β -elemenona (1,23), α -eudesmol (1,12), óxido de cariofileno (1,10), cipereno (0,94), β -elemenol (0,86), ocimeno (0,85), <i>cis</i> -isolongifolanona (0,80), <i>allo</i> -aromadendreno (0,77), γ -terpineno (0,67), borneol (0,66), <i>m</i> -cimen-8-ol (0,66), guaiol (0,62), selina-3,7(11)-dieno (0,53), guaieno (0,52), β -mirceno (0,36), acetato de verbenol (0,36), <i>trans</i> -isolongifolanona (0,36), viridifloreño (0,33), timol (0,31), β -gurjuneno (0,30), <i>endo</i> -fenchol (0,28), terpin-4-ol (0,28), γ -eudesmol (0,22), <i>trans</i> -pinocarveol (0,20), cariofileno (0,20), α -tujeno (0,17), <i>p</i> -cimeneno (0,13), isopentil-2-metilbutanoato (0,11), nerol (0,11), linalol (0,10), terpinoleno (0,09), canfeno (0,06), sabineno (0,06), limoneno (0,03), α -felandreno (0,01), α -terpineno (0,01)	[71]
Óleo essencial das folhas	Hidrodestilação	GC-MS	1,8-cineole (89,95), triciclano (2,95), β -pineno (1,64), <i>o</i> -cimeneno (0,88), terpin-4-ol (0,72), α -terpineol (0,62), mirceno (0,49), terpinoleno (0,38), isopulegol (0,36), <i>trans</i> -pinocarveol (0,30), γ -terpineno (0,25), <i>neo</i> -isopulegol (0,18), α -fencheno (0,17), citranelal (0,16), <i>exo</i> -fenchol (0,13), 1,4-cineole (0,07)	[72]
Óleo essencial das folhas	Hidrodestilação	GC-MS	1,8-cineole (83,89), limoneno (8,16), α -pineno (4,15), <i>o</i> -cimeneno (2,93)	[70]

1. Introdução

Comparando os resultados obtidos para a planta seca [27] e os obtidos para o óleo essencial das folhas secas, obtido através de hidrodestilação e analisado no GC-MS, por Miyamoto *et al.* (2009) [71] (cujo trabalho reporta um maior número de compostos identificados) verifica-se que há compostos que se encontram na planta seca e que são extraídos, como é o caso do 1,8-cineole, α -pineno, aromadendreno, *p*-cimeno (compostos maioritários na planta seca) bem como 4-terpineol, *allo*-aromadendreno, borneol, espatulenol, pinocarveol, viridiflorol, α -terpineol, β -pineno e γ -terpineno. No entanto há muito compostos que aparecem na folha seca e que não aparecem no óleo e vice-versa. Por exemplo o limoneno, que é um dos compostos maioritários da planta seca, não foi identificado no óleo essencial analisado no trabalho do autor já referido nem em outros do mesmo género. Da bibliografia consultada apenas Maciel *et al.* (2010) [70] relatam a existência de limoneno e em quantidades consideráveis (8,16 %). As diferenças nos resultados podem ser devidas ao facto de as amostras em estudo serem diferentes, isto é, as plantas secas estudadas foram colhidas em locais e anos diferentes daquelas que foram usadas para obter os óleos essenciais. Além disso foram usadas técnicas distintas, ou seja, as plantas secas foram analisadas com recurso à técnica de SPME e à cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa com quadrupolo enquanto os óleos foram injectados directamente no aparelho de GC-MS.

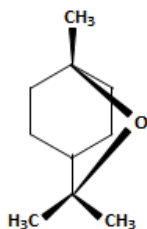
Na literatura são referidos vários efeitos benéficos do *E. globulus* L. (que podem ser consultados na tabela 3) nomeadamente a actividade antibacteriana do extracto metanólico das folhas contra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (microrganismos isolados de pacientes com doenças do tracto respiratório) [73] e actividade antiglicémica estudada em ratos [74]. O óleo essencial das folhas de *Eucalyptus spp.* foi referido por possuir propriedades antifúngicas, antibacterianas, repelente contra mosquitos e antioxidante. Lis-Balchin *et al.* (1998) [75] afirmam que o óleo essencial de eucalipto possui propriedades anti-microbianas quando inalado ou aplicado directamente sobre a pele. Ghedira *et al.* (2008) [68] e Gray e Flatt (1998) [74] referem que o eucalipto pode ser usado no tratamento da diabetes pois possui actividade antiglicémica. Os mesmos autores referem ainda que as folhas adultas sem pecíolo, alguns brotos e frutos (pseudocápsulas) jovens possuem efeito sedativo leve do sistema nervoso central, promovem a respiração, são anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos, e desinfectam as infecções cutâneas e vaginais, as vias respiratória e urinária.

1. Introdução

Tabela 3 — Efeitos benéficos do *E. globulus* L.

Objecto de estudo	Efeitos benéficos	Ref.
Extracto da folha (obtido por extracção com metanol)	Actividade antibacteriana contra <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Haemophilus influenzae</i> (isolados de pacientes com doenças do tracto respiratório)	[73]
Extracto aquoso de folhas	Actividade antibacteriana, antiviral e antioxidante.	[76]
Folhas	Actividade antiglicémica - tratamento da diabetes (em ratos).	[74]
Óleo essencial das folhas	Actividade antioxidante.	[77]
Óleo essencial das folhas	Efeito insecticida contra <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	[70]
Óleo essencial das folhas	Actividade genotóxica contra fungos (<i>Aspergillus nidulans</i>), a uma concentração de 0,12 $\mu\text{L/mL}$	[71]
Óleo essencial de folhas adultas sem pecíolo, alguns brotos e frutos jovens.	Sedativo leve do sistema nervoso central; Promove a respiração; Anti-inflamatório; Antipirético e analgésico; Anti-séptico bactericida (contra <i>Escherichiae</i> , <i>Proteus</i> e <i>Saphtylococcus aureus</i>); Desinfectante das vias respiratória e urinária e das infecções cutâneas e vaginais; Antiviral (contra <i>Herpes simplex</i> (HSV-1 e HSV-2)). Tratamento de diabetes.	[68, 74]
Óleo essencial de folhas	Efeito analgésico (central e periférico) e anti-inflamatório	[78]

O 1,8-cineole, também designado por eucaliptol, e cuja estrutura se encontra representada na figura 15 é, como já foi referido anteriormente, o composto maioritário do óleo essencial das folhas de eucalipto.



1,8-cineole

Figura 15 — Representação esquemática do monoterpene 1,8-cineole.

O composto 1,8-cineole provou ter actividade antifúngica contra *A. flavus* e *A. parasiticus*, quando usado numa concentração de $8,9 \times 10^{-4}$ mg/ μL [72], actividade inibitória sobre a produção de citocinas durante a resposta inflamatória [79] e indução da fragmentação do ADN bem como a inibição da síntese de ADN em células eucariotas [80], como se verifica na tabela 4.

1. Introdução

Tabela 4 — Efeitos biológicos do 1,8-cineole, composto mais abundante no *E. globulus* L.

Obtenção do composto	Tipo de ensaio	Concentração mínima em que o efeito se verifica	Efeito biológico do composto	Ref.
Padrão	<i>in vivo</i>	$8,9 \times 10^{-4}$ mg/ μ L	Actividade antifúngica contra <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> .	[72]
Padrão	<i>in vitro</i>	1,5 μ g/mL	Actividade inibitória sobre a produção de citocinas durante a resposta inflamatória.	[79]
Padrão	<i>in vivo</i>	400 μ M	Induz a fragmentação do ADN e inibe a síntese de ADN em células eucariotas.	[80]

Como pode ser consultado na tabela 3 (referida anteriormente) um dos efeitos benéficos do óleo essencial das folhas de *E. globulus* L. tem a ver com a sua actividade antioxidante [77]. A tabela 5 relata alguns dos trabalhos encontrados relativamente ao estudo do teor total em compostos fenólicos e à actividade antioxidante.

Tabela 5 — Valores de EC₅₀, actividade anti-radicalar (AE) e teor em compostos fenólicos para diferentes amostras obtidas a partir das folhas de *E. globulus* L..

Amostra (folhas)	Compostos fenólicos	EC ₅₀ (quantidade de amostra/quantidade de DPPH \cdot)	AE	Ref.
Extractos metanólicos	30,5 - 72,7 mg de equivalentes de quercitina	—	—	[81]
Infusão	113 \pm 1,33 mg de equivalentes de ácido gálico/240 mL	0,24 \pm 0,01 mg/mg	4,14 \pm 0,1	[82]
Extracto aquoso	—	12,0 \pm 0,9 μ g/mL	—	[76]

Tal como se pode observar na tabela 5, em 1997 Conde *et al.* [81] estudaram a fracção solúvel em éter de extractos obtidos a partir de folhas secas de *E. globulus* L. usando metanol e água (80:20), de plantas localizadas em províncias de Espanha com condições edafoclimáticas diferentes (clima, relevo, litologia, temperatura, humidade do ar, radiação, tipo de solo, vento, composição atmosférica e precipitação pluvial), no que diz respeito ao teor em compostos fenólicos e para isso usaram o método de Folin-Ciocalteu em que o padrão utilizado foi a quercitina. Os valores obtidos variaram entre 30,5 e 72,7 mg de equivalentes de quercitina. Os autores procederam também à identificação, por HPLC, dos componentes fenólicos presentes nos extractos, tendo verificado a presença de ácido gálico, vanilina, ácido elágico, quercitina, elagitanina, luteolina, apigenina, derivado de apigenina, flavonona e derivado de canferol. Em 2008 Proestos *et al.* [83] estudaram o extracto metanólico obtido a partir das folhas de *E. globulus* L. por HPLC tendo

1. Introdução

identificado nesta amostra os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, ácido *p*-cumárico, quercitina e rutina. Atoui *et al.* (2005) [82] estudaram chá e infusões de plantas quanto ao seu conteúdo em polifenóis, à sua actividade antioxidante e ao seu perfil fenólico. O teor em compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e a actividade antioxidante foi calculada usando o método do DPPH[•]. Neste trabalho uma das plantas utilizadas foi o *E. globulus* L. O teor em compostos fenólicos, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/chávena) (em que 1 chávena = 240 mL) foi de $113 \pm 1,33$. A actividade antioxidante determinada foi expressa através do EC₅₀ cujo valor foi de $0,24 \pm 0,01$ mg de extracto/mg de DPPH[•] o que corresponde a uma eficiência anti-radicalar (AE) de $4,14 \pm 0,1$. No ano de 2009 Almeida *et al.* [76] estudaram o extracto aquoso das folhas de *E. globulus* L. relativamente ao efeito sequestrador de radicais através do método de DPPH[•]. Os autores determinaram o valor do EC₅₀ = $12,0 \pm 0,9$ µg de extracto/mL de DPPH[•]. Relativamente ao teor em compostos fenólicos e à actividade antioxidante, determinados pelo método de Folin- Ciocalteu e pelo método do DPPH[•], respectivamente, de óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus globulus* L. nenhuma referência foi encontrada.

1. Introdução

1.6.2. *Citrus limon* L. – Limoeiro

O limoeiro (*Citrus limon* L., pertencente à família Rutaceae) é uma árvore relativamente pequena, originária da Ásia. As folhas do limoeiro são persistentes, apresentam cor verde escura e encontram-se dispostas alternadamente no caule (figura 19).

Na medicina popular a infusão das folhas de *C. limon* L. é muito usada contra os resfriados [69 e 84], nomeadamente contra a febre, como antitússico [69] e expectorante. É ainda usada como antiescorbútico, antiespasmódico, sudorífico, carminativo e digestivo. Há referências ao uso desta infusão como analgésico (incluindo para a dor abdominal e gástrica), hipoglicemiante, depurativo do sangue, sedativo e para o enjoo [69]. Por sua vez a infusão das flores é usada como calmante e o sumo dos frutos é diurético, descongestionante, desinfetante, refrescante, com aplicação, também, em crises nervosas, reumáticas, de tosse rebeldes e infecções da garganta.



Figura 16 — A árvore *Citrus limon* L. e as suas folhas.

Na tabela 6 encontram-se referidos alguns métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis bem como os métodos de análise desses compostos referentes ao *C. limon* L.. A composição, em compostos terpénicos C_{10} e C_{15} , das folhas de limoeiro secas foi anteriormente estudada através de HS-SPME/GC-qMS [27] tendo sido verificado que os compostos maioritários eram o limoneno, β -cariofileno, β -pineno, β -bisaboleno e o isómero do β -ocimeno.

1. Introdução

Tabela 6 — Métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis, métodos de análise e compostos identificados no *C. limon* L..
() — quantidade de composto expressa em termos percentuais. Compostos ordenados por ordem decrescente de quantidade.

Objecto de estudo	Método de extracção do óleo	Método de análise	Compostos terpénicos identificados	Ref.
Folhas secas	-	HS-SPME/GC-qMS	Limoneno (31,19), β -cariofileno (16,85), β -pineno (10,00), β -bisaboleno (5,92), β -ocimeno (isómero) (4,26), sabineno (4,03), nerol (3,12), α -bergamoteno (isómero) (3,10), mirceno (1,83), verbenona (1,75), linalol (1,72), geranial (1,62), geraniol (1,27), β -ocimeno (isómero) (0,89), cimeneno (0,77), α -pineno (0,77), <i>p</i> -cimeneno (0,75), neral (0,70), óxido de cariofileno (0,60), espatulenol (0,57), ocimeno (isómero) (0,56), biciclogermacreno (0,52), <i>allo</i> -ocimeno (0,50), <i>p</i> -menta-1(7), 8-dien-2-ol (isómero) (0,46), α -tujeno (0,45), <i>p</i> -menta-1,5,8-trieno (0,38), δ -3 careno (0,38), citronelal (0,37), aromadendreno (0,33), menta-1,4,8-trieno (0,33), α -curcumenol (0,32), γ -terpineno (0,32), citronelol (0,30), <i>p</i> -2,8-mentadieno-1-ol (isómero) (0,28), mirtenol (0,23), terpinoleno (0,23), carveol (isómero) (0,23), bicicloelemeno (0,23), α -bergamoteno (isómero) (0,22), carvona (0,21), β -farneseno (0,21), α -terpineno (0,20), mirtenal (0,20), β -santaleno (0,15), cariofileno (isómero) (0,15), α -copaeno (0,14), β -elemeno (0,12), pulegona (0,09), óxido de limoneno (isómero) (0,07), isopulegol (0,07), carveol (isómero) (0,05)	[27]
Óleo essencial de folhas	Hidrodestilação	GC-FID	Tujeno, α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -terpineno, δ -3-careno, limoneno, (<i>Z</i>)- β -ocimeno, (<i>E</i>)- β -ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, citronelal, isocitral (<i>cis/trans</i>), terpinen-4-ol, α -terpineol, neral, geranial, acetato de citronelilo, acetato de nerilo, acetato de geranilo, cariofileno, bergamoteno, humuleno, propionato de nerilo, propionato de geranilo, farnaseno e óxido de cariofileno (*)	[16]
Óleo essencial de folhas	Hidrodestilação	GC-MS	β -pineno (23,8), limoneno (19,1), geranial (15,9), neral (11,6), 1,8-cineole (5,2), sabineno (5,1), (<i>E</i>)- β -ocimeno (2,2), linalol (1,9), α -terpineol (1,8), α -pineno (1,5), nerol (1,2), geraniol (1,1), 4-terpineol (1,0), mirceno (0,9), acetato de geranilo (0,8), acetato de nerilo (0,7), γ -terpineno (0,6), citronelal (0,5), citronelol (0,4), (<i>Z</i>)- β -ocimeno (0,4), (<i>E</i>)-cariofileno (0,3), terpinoleno (0,2), α -terpineno (0,2), <i>cis-p</i> -menta-2-en-1-ol (0,1), <i>trans</i> -sabineno hidratado (0,1), 3-careno (0,1), canfeno (0,1), α -tujeno (0,1); compostos em quantidades inferiores a 0,1 %: (<i>E</i>)-nerolidol, (<i>E</i>)- β -farneseno, acetato de citronelilo, óxido de <i>trans</i> -limoneno, <i>allo</i> -ocimeno, <i>p</i> -cimeneno, α -felandreno	[85]
Óleo essencial de folhas	Hidrodestilação	^{13}C RMN	Limoneno (70,5), β -pineno (11,7), γ -terpineno (6,3), sabineno (2,0), α -pineno (1,6), mirceno (1,5), neral (0,6), <i>p</i> -cimeneno (0,9)	[85]

*percentagem não é expressa uma vez que os autores extraíram os óleos essenciais de folhas colhidas em diferentes épocas do ano

1. Introdução

Vários procedimentos podem ser utilizados para extrair os óleos essenciais de diferentes partes da planta *Citrus limon* L., incluindo hidrodestilação (HD), extracção com solvente, extracção por pressão, extracção com fluido supercrítico (SFE), extracção com água subcrítica e prensagem a frio. O método mais comumente utilizado é a hidrodestilação, como se pode verificar pela observação da tabela 6. A parte da planta *C. limon* L. mais usada para obtenção de óleo essencial é a casca do fruto mas há na literatura referência à extracção de óleo a partir de folhas [16, 85]. Em 2002, Vekiari *et al.* [16], extraíram os óleos essenciais das folhas de *C. limon* L., colhidas em diferentes épocas do ano, por hidrodestilação e analisaram-no por GC-FID tendo concluído que o principal componente é o limoneno seguido do β -pineno (monoterpenos do tipo hidrocarboneto). Estes resultados confirmam a definição de Bakkali *et al.* (2008) [6]. Por sua vez os compostos neral, geranial, acetato de nerilo, acetato de geranilo e ocimeno (*Z* e *E*) estão também presentes em grandes quantidades no óleo essencial das folhas. Foram ainda identificados os compostos α -tujeno, α -pineno, β -pineno, canfeno, mirceno, α -terpineno, δ -3-careno, limoneno, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, citronelal, isocitral (isómeros *cis* e *trans*), terpinen-4-ol, α -terpineol, cariofileno, bergamoteno, humuleno e farnaseno. Estes autores verificaram que a maioria dos constituintes do óleo pertence à família dos terpenos e que estes podem ser organizados em dois grupos. O primeiro é o grupo dos hidrocarbonetos terpénicos (monoterpenos e sesquiterpenos), e o segundo é o grupo dos compostos monoterpénicos oxigenados. Os autores verificaram que o segundo grupo era o predominante podendo explicar o aroma forte e característico do óleo essencial das folhas. No mesmo ano e usando o mesmo método de extracção do óleo essencial, Lota *et al.* [85], utilizando como método de caracterização o GC-MS, verificaram que os componentes maioritários foram β -pineno (23,8 %), limoneno (19,1 %), geranial (15,9 %) e neral (11,6 %). Os compostos 1,8-cineole, sabineno, (*E*)- β -ocimeno, linalol, α -terpineol, α -pineno, nerol, geraniol e 4-terpineol, estavam presentes em níveis apreciáveis. Crescimanno *et al.* [86] estudaram o óleo essencial de quatro variedades de folhas de *C. limon* L. e descobriram que o citral (neral e geranial) foi o componente dominante, seguidolimoneno, acetato de nerilo, acetato de geranilo e α - e β -pineno. Noutro estudo, Njoroge *et al.* (1994) [87] relataram que o óleo de folhas de *C. limon* L. japonês consiste principalmente de geranial seguido de limoneno e neral.

1. Introdução

Comparando os resultados obtidos para a planta seca [27] e os obtidos para o óleo essencial das folhas secas obtido por hidrodestilação e analisado por GC-MS [85] verifica-se que há compostos que se encontram na planta seca e que são extraídos, como é o caso do *trans*-cariofileno, β -farneseno, β -ocimeno, δ -3-careno, 4-terpineol, óxido de limoneno, citronelal, geranial, limoneno, linalol, mirceno, neral, sabineno, terpinoleno, α -bergamoteno, α -pineno, α -terpineno, α -terpineol, α -tujeno, β -bisaboleno, β -pineno e γ -terpineno. Por outro lado há outros compostos que só são identificados nas folhas secas como é o caso dos álcoois carveol, citronelol, espatulenol, geraniol, isopulegol, mirtenol e nerol; do aldeído mirtenal e das cetonas pulegona e verbenona. As diferenças nos resultados podem ser explicadas, primeiro pelo facto de as amostras nos estudos serem diferentes, (as plantas secas estudadas foram colhidas em locais e anos diferentes daquelas que foram usadas para obter os óleos essenciais) e segundo porque foram usadas técnicas distintas (as plantas secas foram analisadas com recurso à técnica de SPME e à cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa com quadrupolo enquanto os óleos foram injectados directamente no aparelho de GC-MS).

A tabela 7 diz respeito aos efeitos benéficos relatados na literatura para o *C. limon* L..

Tabela 7 – Efeitos benéficos do *C. limon* L.

Objecto de estudo	Efeitos benéficos	Ref.
Óleo essencial de flores, folhas e caules jovens	Possui flavonóides com actividade antioxidante.	[88]
Óleo essencial da casca do fruto	Propriedades antibacterianas contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157 e <i>Campylobacter jejuni</i> .	[89]
Óleo essencial da casca do fruto	Actividade antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>Penicillium verrucosum</i> .	[90]
Óleo essencial da casca do fruto	Usado em aromaterapia para aliviar a ansiedade, o <i>stress</i> e a depressão.	[91]
Fruto	Fonte de vitamina C, minerais, fibras alimentares, ácidos orgânicos, carotenóides e flavonóides (com actividade antioxidante).	[92]
Fruto	Analgésico, antianémico, antiemético, antiesclerótico, antipirético, anti-séptico, demulcente, hidratante.	[93]
Fruto	Antidiarreico, diurético, protector da mucosa intestinal, homostático local, estimulante e protector vascular, vitamínico.	[93]

Na literatura foi encontrado um estudo relativo ao óleo essencial, extraído de flores, folhas e caules jovens, que demonstraram a presença de flavonóides com actividade antioxidante [88]. Mais estudos foram encontrados no que diz respeito ao óleo essencial da casca do fruto pois é este que é usado em aromaterapia para aliviar a ansiedade, o *stress* e a depressão [91]. As propriedades antibacteriana e antifúngica também são referidas [89 e 90]. Tendo em conta que o limão, fruto do *C. limon* L., é bastante consumido pela

1. Introdução

população na literatura há relatos dos seus efeitos benéficos para a saúde, efeitos esses que podem ser consultados na tabela 7.

Tal como referido anteriormente, o limoneno (figura 17) é um dos principais componentes dos óleos cítricos, em alguns casos com concentrações de 88 % [94].

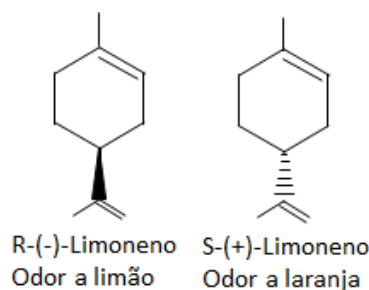


Figura 17 — Representação esquemática dos isómeros de limoneno.

Outros compostos terpénicos existem no óleo essencial em quantidades consideráveis como é o caso do β -pineno, do linalol e do citral (mistura de isómeros) representados na figura 18. São estes compostos maioritários que são responsáveis pelos principais efeitos biológicos do óleo.

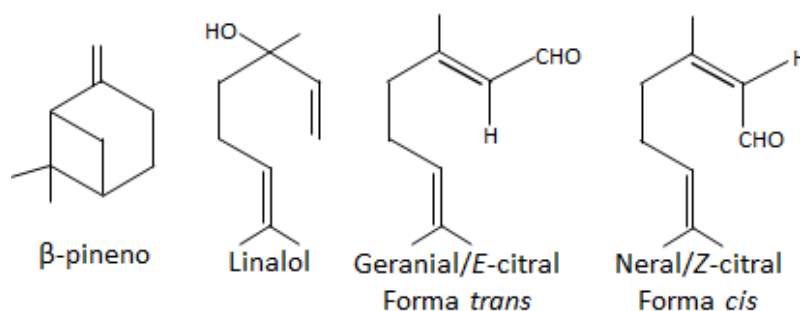


Figura 18 — Representação esquemática do β -pineno, do linalol e do citral (*E* e *Z*), compostos presentes em quantidades consideráveis no óleo essencial das folhas de *C. limon* L..

Quanto ao teor total em compostos fenólicos e à determinação da actividade antioxidante nenhum estudo foi encontrado relativo ao óleo essencial obtido a partir de folhas de *C. limon* L., os estudos encontrados diziam respeito a óleos essenciais obtidos da casca do limão [95] [96] [97]. Em 2004 Del Rio *et al.* [88], extraíram flavonóides a partir de folhas jovens, caules jovens, flores e frutas de *C. limon* L. secos a 50 °C numa estufa, moídos num pó fino e extraídos com dimetil sulfóxido (DMSO) numa proporção de 6 mg de peso seco / mL, durante 30 minutos. Os extractos correspondentes foram filtrados e de seguida analisados por HPLC tendo identificado três flavonóides com actividade antioxidante: hesperidina, diosmina e eriocitrina.

1. Introdução

1.6.3. *Hypericum androsaemum* L. – Hipericão do Gerês

Actualmente verifica-se um aumento na utilização terapêutica do género *Hypericum* L. (da família Guttiferae). Desde a medicina tradicional aos mais recentes antidepressivos que é conhecida a actividade farmacológica destas plantas, nomeadamente nas últimas investigações é referida a importância da actividade antidepressiva do *Hypericum perforatum* L. e doença arterial coronária [98].

O *Hypericum androsaemum* L. (figura 19) de nome comum hipericão do Gerês, cresce em locais selvagens e sombrios, nomeadamente no norte de Portugal, no Parque Nacional Peneda do Gerês, onde é amplamente usado como uma erva medicinal. O *H. androsaemum* L. é um arbusto resistente que pode atingir facilmente 1 metro de altura e 60-80 cm de diâmetro. Este arbusto apresenta caules erectos e folhas com 1-10 x 0,8-6 cm, largamente ovadas e sésseis (sem pecíolo). Entre Junho e Setembro floresce e apresenta inúmeras flores amarelas, que evoluem em frutos que podem apresentar várias cores distintas ao longo do processo de maturação.



Figura 19 — A planta de *Hypericum androsaemum* L. e as suas folhas e flores.

A população prepara uma infusão das partes aéreas (que inclui folhas, flores e caules) desta espécie pois possui efeitos benéficos para a saúde nomeadamente actuando como colagogo (aumenta a secreção da bÍlis no intestino devido à contracção muscular da vesícula biliar), diurético e no tratamento da insuficiência renal [20], hepatoprotector [20 e 69], sedativo, anti-hipertensivo e para a boa disposição [20].

Na tabela 8 encontram-se referidos alguns métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis bem como os métodos de análise desses compostos referentes ao *H. androsaemum* L..

1. Introdução

Tabela 8 — Métodos de extracção do óleo essencial e dos seus compostos voláteis, métodos de análise e compostos identificados no *H. androsaemum* L..
() — quantidade de composto expressa em termos percentuais. Compostos ordenados por ordem decrescente de quantidade.

Objecto de estudo	Método de extracção do óleo	Método de análise	Compostos terpénicos identificados	Ref.
Planta seca	—	HS-SPME/GC-qMS	β -cariofileno (54,17), γ -elemeno (19,64), α -humuleno (10,19), β -elemeno (3,17), δ -cadineno (2,84), β -selineno (1,78), α -amorfenol (1,26), α -ilangeno (1,18), α -copaeno (0,90), calameneno (isómero) (0,67), α -calacoreno (0,51), óxido de cariofileno (0,41), <i>allo</i> -aromadendreno (isómero) (0,40), α -himachaleno (0,38), α -cubebeno (0,34), aromadendreno (0,32), limoneno (0,28), <i>p</i> -cimeno (0,26), cimeneno (0,18), β -bourboneno (0,14), <i>allo</i> -aromadendreno (isómero) (0,13), junipeno (0,10), espatulenol (0,10)	[27]
Óleo essencial (partes aéreas: folhas, flores e caules)	Hidrodestilação	GC-MS	β -cariofileno (12,5), γ -elemeno (8,5), β -gurjuneno (6,1), limoneno (5,9), germacreno D + γ -curcumeno (5,0), β -pineno (4,2), terpinoleno (3,9), γ -muuruleno (3,8), α -guaieno + β -humuleno (3,4), germacreno D (isómero) (1,9), (<i>E</i>)- β -ocimeno (1,4), β -elemeno (1,1), <i>epi</i> - α -muuroiol (1,1), mirceno (0,9), (<i>E</i>)- γ -bisaboleno (0,9), β -selineno (0,8), α -(<i>E,E</i>)-farneseno (0,7), δ -elemeno (0,6), δ -cadineno (0,6), <i>epi</i> - α -cadinol (0,6); compostos em quantidades inferiores a 0,5 %: α -pineno, γ -terpineno, α -tujona, acetato de α -terpenilo, germacreno D (isómero), α -selineno, germacreno B, α -zingibereno, α -muuruleno, (<i>Z</i>)- γ -bisaboleno, óxido de cariofileno, α -eudesmol, α -cadinol, <i>epi</i> - α -bisabolol, 8-cedrano-13-al.	[20]
Óleo essencial (folhas secas)	Hidrodestilação	GC-MS	Óxido de cariofileno (35,8), ishwarano (30,5), humuleno epóxido II (5,6), (<i>E</i>)- β -farneseno (4,2), cedróxido (3,6), β -cariofileno (2,4), <i>cis</i> - β -guaieno (2,1), valenceno (1,9), acetato de cedr-8(15)-en- α -ol (1,3), <i>allo</i> -aromadendreno epóxido (1,3), éter de italiceno (1,2), kusunol (1,2), β -selineno (0,9), himachalol (0,8), β -bisaboleno (0,6), 8- α -11-elemodiol (0,6), γ -muuroleno (0,6), β -acoradieno (0,6), β -gurjuneno (0,6), acetato de β -eudesmol (0,5), γ -selineno (0,5), γ -cadineno (0,5), β -bourboneno (0,5), dendrolasina (0,4), α -copaeno (0,3)	[22]
Óleo essencial (flores secas)	Hidrodestilação	GC-MS	α -guaieno (40,2), óxido de cariofileno (28,0), kusunol (4,2), β -selineno (3,2), eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol (3,1), humuleno epóxido II (3,0), <i>epi</i> - α -cadinol (3,0), cedróxido (1,9), α -santaleno (1,7), selin-11-en-4- α -ol (1,6), limoneno (1,3), valenceno (1,2), acetato de β -bisabolol (1,0), éter de italiceno (0,8), α -ciperona (0,6), eudesm-7(11)-en-4-ol (0,6), 5-isocedranol (0,6), 2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -farnesol (0,5), <i>cis</i> -muurolo-3,5-dieno (0,5), γ -selineno (0,4), γ -cadineno (0,3), palustrol (0,3), α -copaeno (0,2), 14-hidroxi- α -muuroleno (0,2), β -pineno (0,2)	[22]

1. Introdução

A composição em compostos terpénicos C₁₀ e C₁₅ da planta seca de *H. androsaemum* L. foi estudada [27] tendo-se identificado como compostos maioritários o β -cariofileno, o γ -elemeno, o α -humuleno, o β -elemeno e o δ -cadineno. Os óleos essenciais, obtidos das partes aéreas de plantas de *H. androsaemum* L. cultivadas em Portugal e colhidas em diferentes épocas também foram estudados [20]. A hidrodestilação foi o método usado para a sua obtenção e como método de análise utilizou-se o GC-MS, o que permitiu identificar vários compostos (como se pode ver pela tabela 10) sendo que quase 50 % do total de óleo essencial de plantas *H. androsaemum* L., colhidas em Novembro de 1999, foi constituído por três sesquiterpenos: β -cariofileno (15,1 %), β -gurjuneno (15,5 %), e γ -elemeno (17,9 %) (ver figura 20). Estes compostos estavam ainda entre os principais constituintes dos óleos essenciais de plantas colhidas em Julho de 1999 e Junho de 2000. No entanto, em vez de um sesquiterpeno, o composto maioritário na amostra de óleo essencial de Junho de 2000 foi um monoterpreno: limoneno (15,4 %). Estes resultados mostram que a composição do óleo é afectada pela altura em que se procede à colheita. Os autores concluíram que, independentemente da época de colheita, os hidrocarbonetos sesquiterpénicos constituem o grupo de compostos maioritários, representando entre 40 a 78 % do total dos compostos do óleo essencial.

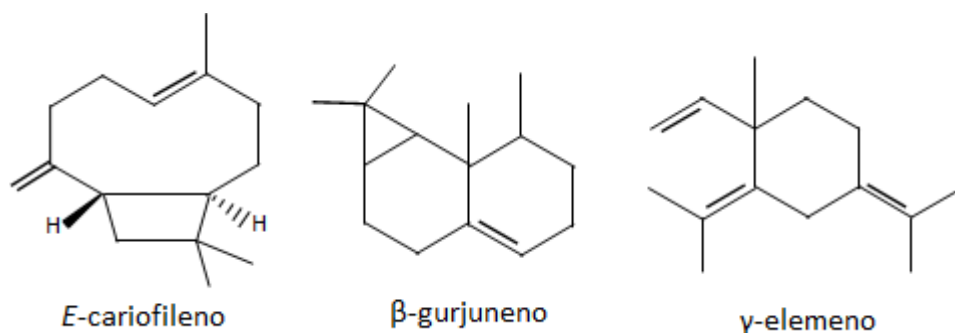


Figura 20 — Representação esquemática dos sesquiterpenos que são componentes maioritários do óleo essencial de *H. androsaemum* L..

Em 2005 Morteza-Semnani e Saeedi [22], por hidrodestilação, obtiveram o óleo essencial das folhas de *H. androsaemum* L. e o óleo essencial de flores de *H. androsaemum* L. e analisaram-nos por GC-MS tendo alcançado diferentes resultados em termos de composição terpénica. Os autores verificaram que há compostos que aparecem no óleo da folha e não aparecem no das flores, com é o caso do β -cariofileno, β -gurjuneno, (*E*)- β -farneseno, ishwarano, γ -muuroleno, entre outros. Da mesma forma há compostos que só aparecem no óleo das flores: β -pineno, limoneno, α -santaleno, α -guaieno, acetato de β -

1. Introdução

eudesmol e acetato de α -bisabolol, para além de outros. Os constituintes maioritários no óleo das folhas foram o óxido de cariofileno (35,8 %), ishwarano (30,5 %) e epóxido de humuleno II (5,6 %). Por sua vez os principais constituintes do óleo essencial das flores foram o α -guaieno (40,2 %) e óxido de cariofileno (28,0 %) (ver figura 21).

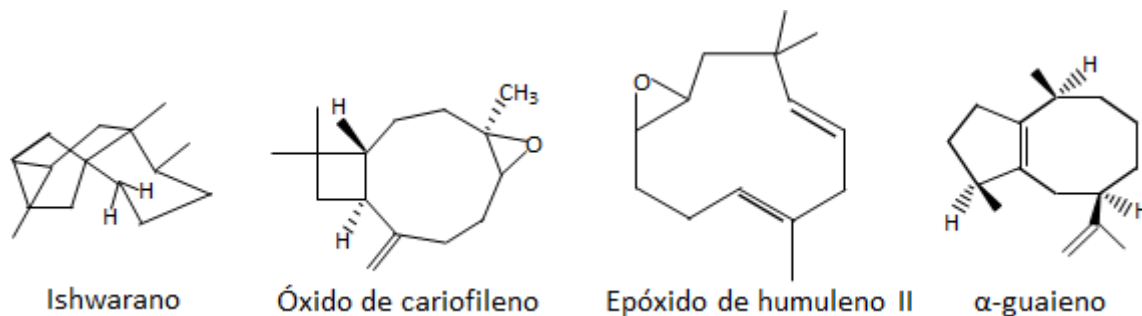


Figura 21 — Representação esquemática dos componentes maioritários do óleo essencial de *H. androsaemum* L. (folhas e flores).

Verificou-se que os óleos essenciais das folhas e das flores de *H. androsaemum* L. são ricos em sesquiterpenos mas, como pode ser visto a partir das informações mencionadas acima, os óleos essenciais de folhas e flores não são muito semelhantes.

Comparando os resultados obtidos para a planta seca [27] e os obtidos para o óleo essencial da parte aérea seca obtido por hidrodestilação e analisado por GC-MS [20] verifica-se que há compostos que se encontram na planta seca e que são extraídos, como é o caso do *allo*-aromadendreno, germacreno D, limoneno, óxido de cariofileno, *trans*-cariofileno, α -copaeno, α -himachaleno, α -ilangeno, β -elemeno, β -selineno, δ -cadineno, α -humuleno e γ -elemeno. No entanto há outros compostos que aparecem na folha seca e que não aparecem no óleo: neral, óxido de cariofileno, *p*-cimeno, α -amorfeno, α -calacoreno, α -copaeno, α -cubebeno, α -himachaleno, α -terpineol, γ -selineno e γ -elemeno. Há também compostos identificados no óleo que não foram identificados na planta seca: α -guaieno, α -muuruleno, α -pineno, α -selineno, α -tujeno, α -tujona, α -zingibereno, β -bourboneno, β -chamigreno, β -gurjuneno, β -pineno, γ -muuruleno, γ -terpineno e δ -elemeno, entre outros. Verifica-se que no óleo se identificam mais compostos do que na planta seca. As diferenças nos resultados relativos à planta seca e aos óleos podem ser explicadas pelo facto de serem amostras diferentes, (as plantas secas estudadas foram colhidas em locais e anos diferentes daquelas que foram usadas para obter os óleos essenciais) e também devido à diferença nas técnicas utilizadas (as plantas secas foram analisadas com recurso à técnica

1. Introdução

de SPME e à cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa com quadrupolo enquanto os óleos foram injectados directamente no aparelho de GC-MS.

Para além dos efeitos benéficos já relatados anteriormente e que se encontram mencionados na tabela 9, na literatura refere-se ainda que a infusão possui actividade antioxidante [76 e 99], nomeadamente contra os radicais superóxido e hidroxilo e ainda o ácido hipocloroso [99].

Tabela 9 — Efeitos benéficos do *H. androsaemum* L.

Objecto de estudo	Efeitos benéficos	Ref.
Parte aérea (folhas, flores, caules)	Colagogo, hepatoprotector, diurético, tratamento da insuficiência renal.	[20]
Parte aérea (folhas, flores, caules)	Sedativo, hepatoprotector, anti-hipertensivo, para a boa disposição.	[69]
Parte aérea (folhas, flores, caules)	Actividade antioxidante contra os radicais superóxido e hidroxilo e o ácido hipocloroso.	[99]

Quanto ao teor total em compostos fenólicos, EC₅₀ e actividade anti-radicalar (AE), determinados em diferentes extractos obtidos usando folhas de *H. androsaemum* L. alguns dos trabalhos encontrados referem-se na tabela 10.

Tabela 10 — Valores de EC₅₀ e teor em compostos fenólicos para diferentes amostras obtidas a partir das folhas de *H. androsaemum* L..

Amostra (folhas)	Compostos fenólicos	EC ₅₀	Ref.
Extracto etanólico	39,08 mg de equivalentes de pirogalol/kg de material vegetal liofilizado	—	[100]
Extracto aquoso	54,28 mg de equivalentes de pirogalol/kg de material vegetal liofilizado	—	[100]
Extracto aquoso	109 ± 5,4 µg de equivalentes de pirogalol/mg de extracto seco	11,1 ± 0,5 µg de extracto seco/mL de DPPH'	[101]
Extracto aquoso	153,8 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco	92,24 %	[102]
Extracto aquoso	—	23 µg de extracto seco/L de DPPH'	[103]

Como se pode verificar pela observação da tabela 10, Ozen, Ayan *et al.* (2005) [100] estudaram extractos aquosos e extractos etanólicos de várias espécies de *Hypericum* quanto à sua quantidade de fenólicos totais solúveis. Os autores fizeram uma curva padrão usando pirocatecol e a quantidade de compostos fenólicos totais nos extractos aquosos e etanólicos foi calculada como equivalentes de pirocatecol, em miligramas, por quilograma de material vegetal liofilizado. Para o *H. androsaemum* L. o extracto aquoso apresentou um teor em

1. Introdução

compostos fenólicos de 54,28 enquanto o extracto etanólico apresentou um valor de 39,08. No ano de 2010 Hernandez *et al.* [101] estudaram o extracto aquoso de *H. androsaemum* L. quanto à sua actividade antioxidante e ao teor em compostos fenólicos. Para determinar a actividade antioxidante usaram o método de DPPH[•] tendo obtido um valor de EC₅₀ de $11,1 \pm 0,5$ µg de extracto seco/mL. Para determinar o teor em compostos fenólicos totais foi usada espectrofotometria usando como padrão o pirogallol e a concentração de compostos fenólicos foi determinada em microgramas de equivalentes de pirogallol e o valor obtido desta forma foi de $109 \pm 5,4$ µg equivalentes de pirogallol/mg de extracto seco. No ano seguinte, Rainha *et al.* [102] estudaram o extracto aquoso obtido das partes aéreas de várias espécies de *Hypericum* relativamente à actividade antioxidante e ao perfil em compostos fenólicos. A actividade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH[•] e foi verificado que a actividade anti-radicalar do *H. androsaemum* L. foi de 92,24 %. O teor em compostos fenólicos foi determinado através do método Folin-Ciocalteu e foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extracto seco (dE). O resultado obtido para o *H. androsaemum* L. foi de 153,8 mg GAE g⁻¹ dE. Os autores afirmam que os resultados que obtiveram também mostraram que nem sempre há uma correlação directa entre teor em compostos fenólicos e a actividade antioxidante. No mesmo ano Dopico-Garcia *et al.* [103] e usando também o extracto aquoso obtido das partes aéreas de *H. androsaemum* L. determinaram a sua actividade anti-radicalar em relação ao radical DPPH[•] tendo obtido um valor de EC₅₀ igual a 23 µg/L. Em 2009 Dias *et al.* [104] estudaram o extracto metanólico desta espécie relativamente à composição em compostos fenólicos usando HPLC tendo identificado os seguintes compostos: ácidos 3- e 5-*o*- cafeoilquínicos, ácido cafeico, canferol, quercitina e seus derivados. Quanto ao óleo essencial obtido a partir de folhas de *H. androsaemum* L. nenhum estudo foi encontrado relativo ao valor de EC₅₀ e à actividade anti-radicalar (AE) bem como em relação ao teor total em compostos fenólicos.

2. Objetivos

2. Objectivos

A população portuguesa usa diversas espécies de plantas na medicina tradicional, entre estas destacam-se o *Eucalyptus globulus* L., o *Citrus limon* L. e o *Hypericum androsaemum* L.. Estudos anteriores mostraram que estas plantas podem ser consideradas uma fonte potencial de compostos terpénicos [16, 20, 22, 27, 70, 71, 72, 85], aos quais têm sido atribuídos inúmeros benefícios para a saúde humana [68, 70, 71, 73, 74, 76, 77, 78, 88, 89, 90, 91].

Com vista a futura valorização destas três plantas, este trabalho têm como objectivos:

- 1) Determinação do perfil metabólico das plantas secas baseado na composição em compostos mono e sesquiterpénicos, por recurso a uma técnica de elevada resolução e sensibilidade, a qual deve permitir a identificação de novos compostos;
- 2) Obtenção de óleos essenciais a partir dessas plantas;
- 3) Caracterização dos óleos essenciais no que respeita a compostos mono e sesquiterpénicos;
- 4) Avaliação da actividade antioxidante dos óleos essenciais;

Para o estudo detalhado da fracção terpénica (C_{10} e C_{15}) das plantas secas e respectivos óleos essenciais recorreu-se à cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (GC \times GC-ToFMS). De forma a avaliar a actividade antioxidante dos óleos essenciais recorreu-se ao método de DPPH $^{\bullet}$.

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Amostras

No presente trabalho foram utilizadas três espécies de plantas: *Eucalyptus globulus* L., *Citrus limon* L. e *Hypericum androsaemum* L.. Quanto ao *E. globulus* L. e ao *C. limon* L. usaram-se as folhas de plantas recolhidas na mesma zona geográfica, pertencente ao distrito de Aveiro, colhidas em Outubro de 2010. Em relação ao *H. androsaemum* L. usou-se uma amostra comercial. As folhas de *E. globulus* L. e *C. limon* L. depois de colhidas foram secas num local seco e arejado, ao abrigo da luz.

3.2. Materiais e reagentes

Foi utilizado o DPPH[•] (95,0 % Fluka) e o metanol (99,8 % Fluka) da Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha), o ácido gálico (99,0 % Panreac) da Panreac Química, S.A.U. (Barcelona, Espanha) e uma solução de alcanos compreendida entre C₈-C₂₀ da Fluka da Sigma-Aldrich Química S.A. Utilizou-se um suporte manual de SPME da Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA) e o revestimento de Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm de espessura da fase estacionária), também da Supelco. Tendo em conta a recomendação do produtor o revestimento da fibra foi condicionado a uma temperatura de 270 °C durante 1 hora. Para a injeção directa dos óleos foi utilizada uma seringa 2 µL da Agilent Technologies.

3.3. Métodos

3.3.1. Análise da composição terpénica em C₁₀ e C₁₅ das plantas secas por HS-SPME/GC × GC-ToFMS

As folhas de *Eucalyptus globulus* L. e *Citrus limon* L. foram cortadas em pequenos pedaços, de dimensão semelhante (0,5 cm x 0,5 cm). As folhas de *Hypericum androsaemum* L. da amostra comercial já estavam no tamanho adequado. Os pedaços de folhas foram então colocados em frascos de vidro (35,0 mL) de modo a manter uma razão volume de espaço-de-cabeça/volume da amostra (β) constante: $1/\beta = 0,5$ [37]. Os frascos foram fechados com um septo de PTFE e uma tampa de rosca (GL 18, Schott). Durante 20 minutos o frasco de SPME, já com a fibra de SPME inserida no espaço de cabeça, foi colocado num banho de água termostaticado (40 °C \pm 1,0) extraindo-se assim os compostos voláteis emitidos pelas folhas seca das plantas. Por fim, recolheu-se a fibra para o interior do suporte. A fibra de SPME foi então introduzida no injector do cromatógrafo,

3. Materiais e métodos

que se encontrava a 250 °C, onde permaneceu durante 3 minutos para permitir a dessorção térmica dos compostos. O injetor tem no seu interior um *liner* de vidro de 0,75 mm de diâmetro interno (Supelco). A injeção ocorreu em modo *splitless* durante 3 minutos. Foram realizadas três réplicas para cada amostra.

Utilizou-se o equipamento GC × GC-ToFMS (figura 23) da LECO Pegasus 4D (LECO, St. Joseph, MI, EUA) constituído por um cromatógrafo a gás Agilent GC 7890 com um modulador criogénico (da Zoex) e um forno secundário. O detector é um espectrómetro de massa ToF de alta velocidade.



Figura 22 — Aparelho Pegasus® 4D GC × GC-ToFMS [105].

Como coluna de primeira dimensão usou-se a HP-5 de 30 m de comprimento e 0,320 mm de diâmetro interno com 0,25 µm de espessura de filme (da Agilent Technologies) e como segunda coluna foi usada uma DB-FFAP de 1 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme (também da Agilent Technologies). Como gás de arraste usou-se o hélio a um caudal constante de 2,5 mL min⁻¹. A temperatura do primeiro forno foi programada a partir de 40 (1 min) a 70 °C a um ritmo de 10 °C min⁻¹, seguida de um aumento para 120 °C a um ritmo de 1 °C min⁻¹ e por fim um aumento para 220 °C (1 min) a um ritmo de 70 °C min⁻¹. A temperatura do forno secundário foi programada a partir de 55 (1 min) a 85 °C a um ritmo de 5 °C min⁻¹ seguida de um aumento para 135 °C a um ritmo de 1 °C min⁻¹ e por fim um aumento para 235 °C (2 min) a um ritmo de 70 °C min⁻¹. A temperatura da linha de transferência MS foi de 250 °C e a temperatura da fonte MS foi de 250 °C. O tempo de modulação foi de 8 segundos e a temperatura do modulador foi mantida 20 °C acima da do forno primário. O sistema ToFMS foi operado a uma taxa de armazenamento de espectro de 100 espectros s⁻¹. O espectrómetro de massa foi operado no modo impacto electrónico (EI) a 70 eV, utilizando uma gama de *m/z* 33-350. Estas condições de análise usadas no GC × GC-ToFMS encontram-se esquematizadas na tabela 11 que se segue.

3. Materiais e métodos

Tabela 11 — Condições de análise usadas no GC × GC-ToFMS.

Condições do GC × GC	
Injector	<i>Splitless</i> (3 minutos), <i>liner</i> 0,75 mm, 250 °C
Gás de arraste	Hélio a um caudal constante de 2,5 mL min ⁻¹ .
Coluna (1ª Dimensão)	HP-5 30 m x 0,320 mm de diâmetro interno; 0,25 µm de espessura de filme
Primeiro forno	40 °C durante 1 minuto 40 °C até 70 °C a um ritmo de 10 °C min ⁻¹ 70 °C até 120 °C a um ritmo de 1 °C min ⁻¹ 120 °C até 220 °C (1 min) a um ritmo de 70 °C min ⁻¹ 220 °C durante 1 minuto
Tempo de modulação	8 segundos
Temperatura do modelador	20 °C acima da temperatura do forno primário
Coluna (2ª Dimensão)	DB-FFAP 1 m x 0,25 mm de diâmetro interno; 0,25 µm de espessura de filme
Segundo forno	55 °C durante 1 minuto 55 °C até 85 °C a um ritmo de 5 °C min ⁻¹ 85 °C até 135 °C a um ritmo de 1 °C min ⁻¹ 135 °C até 235 °C a um ritmo de 70 °C min ⁻¹ 235 °C durante 2 minutos
Condições do ToFMS	
Intervalo <i>m/z</i>	Modo <i>fullscan</i> 30-300 <i>m/z</i>
<i>Scan/s</i>	100 espectros s ⁻¹
Impacto electrónico	70 eV
Temperatura da linha de transferência MS	250 °C
Temperatura da fonte MS	250 °C

3.3.2. Obtenção dos óleos essenciais usando destilação por arrastamento de vapor

As folhas de *Citrus limon* L. e as de *Eucalyptus globulus* L. foram cortadas em pequenos pedaços, de dimensão semelhante (1 cm x 1cm), e efectuou-se a sua pesagem. Relativamente ao *Hypericum androsaemum* L. a amostra comercial já estava fragmentada no tamanho adequado tendo-se procedido apenas à sua pesagem. Cada uma das três plantas foi submetida a uma destilação por arrastamento de vapor com vista a obter os respectivos óleos essenciais (figura 23). Depois da destilação por arrastamento de vapor recolheu-se o óleo, o qual foi seco com sulfato de sódio anidro. Os óleos foram depois colocados em recipientes de vidro e pesados sendo então armazenados num congelador.

3. Materiais e métodos

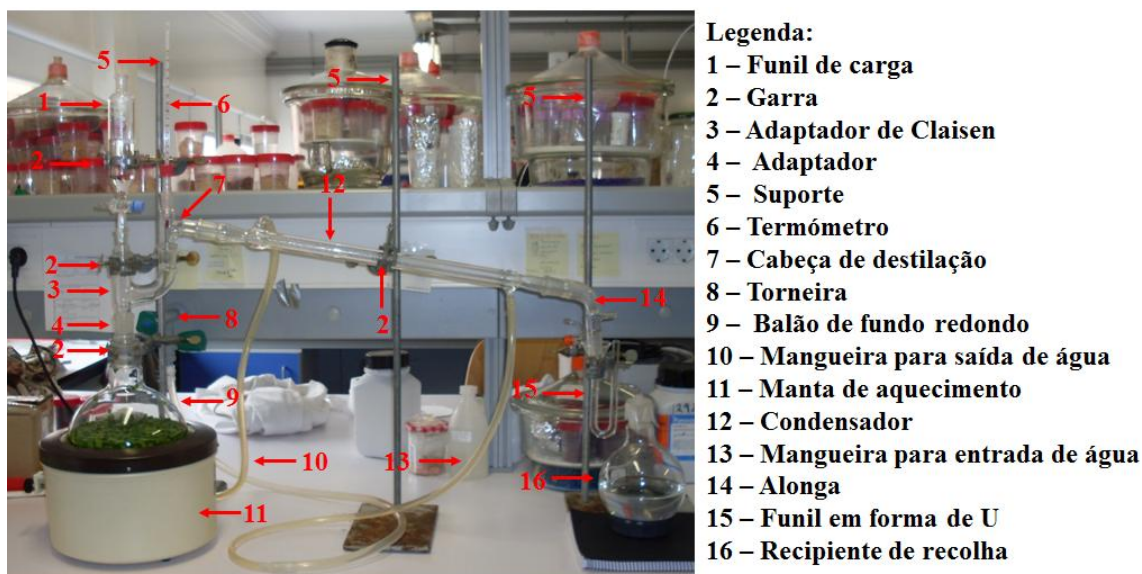


Figura 23 — A montagem da destilação por arrastamento de vapor usada neste trabalho.

3.3.3. Análise da composição terpénica em C_{10} e C_{15} dos óleos essenciais por GC \times GC-ToFMS

Para analisar os compostos terpénicos em C_{10} e C_{15} uma determinada quantidade (0,2 μ L) de cada óleo foi injectada no cromatógrafo. A agulha da seringa foi introduzida no injector do GC, que se encontra a uma temperatura de 250 °C. O injector tinha no seu interior um *liner* de vidro de 4 mm de diâmetro interno (Supelco). A injeção ocorreu em modo *split* numa proporção de 1/100. Foram realizadas três réplicas para cada óleo essencial. Foram utilizadas as condições cromatográficas do GC \times GC-ToFMS referidas anteriormente para as plantas secas (3.3.1.).

3.3.4. Processamento dos dados GC \times GC-ToFMS das plantas secas e dos respectivos óleos essenciais

Para o tratamento de dados a mesma abordagem foi efectuada para as plantas secas e para os respectivos óleos essenciais. De todos os compostos presentes nas três réplicas de cada amostra (numa média de 877, 692 e 481 para as plantas secas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L., respectivamente e 193, 91 e 115 para os respectivos óleos essenciais o estudo foi focado nos compostos terpénicos (C_{10} e C_{15}) cuja identificação efectuada pelo *software* foi confirmada ou alterada depois de se proceder a uma inspecção manual dos espectros de massa obtidos em comparação com os espectros fornecidos pelas livrarias. De modo a avaliar a qualidade geral da separação usaram-se diagramas de

3. Materiais e métodos

contornos. Os cromatogramas em corrente total de íão (TIC) foram processados usando o *software* ChromaToF (LECO) com S / N limiar de 100 e para a identificação dos compostos foram utilizadas as bases de dados: Wiley 275 e NIST (US National Institute of Science and Technology), V. 2.0, Mainlib e Replib). Um factor de correspondência espectral (similaridade > 700) foi usado para decidir se um pico foi correctamente identificado ou não. Efectuou-se ainda ao cálculo dos índices de retenção (R.I.) tendo para isso sido utilizada uma série de alcanos C₈-C₂₀. Os valores dos R.I. calculados foram comparados com os valores relatados na literatura para colunas cromatográficas semelhantes à utilizada como coluna de primeira dimensão (HP-5).

Depois da identificação dos compostos (C₁₀ e C₁₅), nas três réplicas de cada espécie de planta em estudo neste trabalho, determinou-se a sua área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a), e calculou-se a sua média, cujo total foi determinado e usado para calcular a % de área cromatográfica relativa para cada grupo de compostos. A reprodutibilidade nas réplicas foi expressa como coeficiente de variação (CV).

3.4. Avaliação da actividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método de DPPH[•]

Para determinar a actividade antioxidante dos óleos essenciais, obtidos por destilação por arrastamento d e vapor, das plantas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L. utilizou-se o método de DPPH[•] e para tal obteve-se uma curva de calibração preparando-se soluções de DPPH[•] em metanol com as seguintes concentrações: 21,0, 42,0; 63,0; 77,0; 98,0; 119,0 e 140,0 µmol/L. Efectuou-se de seguida a leitura das absorvâncias (a 515 nm), em triplicado, e traçou-se um gráfico A₅₁₅ em função da concentração de DPPH[•]. O espectrofotómetro utilizado para as medições da absorvância foi o modelo 6405 UV/Vis, Jenway.

Foi medida a absorvância do branco (25 µL de metanol com 975 µL de solução de DPPH[•]) a 515 nm no minuto 0 da reacção e substituindo este valor na equação obtida para a curva de calibração de DPPH[•] calculou-se a concentração real de DPPH[•] utilizada. Para cada óleo puro, bem como para as diluições necessárias (de modo a ser possível a obter valores acima e abaixo dos 50 % de DPPH[•] restante) fez-se reagir 25 µL com 975 µL da solução de DPPH[•] e mediu-se a absorvância no minuto 1, 5, 10, 15 e posteriormente de 15 em 15 minutos até aos 90 minutos. Através do registo das absorvâncias é possível observar a variação das absorvâncias no meio reaccional e verifica-se que o valor da absorvância

3. Materiais e métodos

diminui até atingir um valor constante (considerando-se que a reacção atingiu a estabilidade). Posteriormente foi calculada a percentagem de DPPH[•] restante considerando a absorvância do branco igual a 100 % de DPPH[•] restante e de seguida, para cada óleo, foi traçado um gráfico da percentagem de DPPH[•] restante em função do tempo de reacção decorrido. Para determinar o EC₅₀ para cada óleo calculou-se a actividade anti-radicalar (que é definida como sendo a quantidade de antioxidante necessária para fazer diminuir a concentração inicial de DPPH[•] para 50 %).

A actividade antioxidante para o ácido gálico também foi determinada, uma vez que este é considerado um antioxidante de referência [106] e para isso foram preparadas várias soluções de ácido gálico em metanol (de modo a ser possível obter valores acima e abaixo dos 50 % de DPPH[•] restante).

4. Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Estudo da composição terpénica em C₁₀ e C₁₅ das plantas secas

A composição terpénica em C₁₀ e C₁₅ das folhas secas de *E. globulus* L. e de *C. limon* L. e da amostra comercial de *H. androsaemum* L. foi determinada com recurso à técnica de micro-extração em fase sólida, em modo de espaço-de-cabeça, e à cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME/GC × GC-ToFMS).

Na figura 24 apresentam-se os diagramas de contornos do GC × GC-ToFMS, em corrente total de iões, referentes às folhas secas das três espécies de plantas em estudo. Foram usadas as seguintes massas de amostra: *E. globulus* L. = 5,39 g, *C. limon* L. = 1,16 g e *H. androsaemum* L. = 0,54 g.

Pela análise dos diagramas de contornos pode verificar-se que os compostos ficam organizados em quatro grupos:

1. compostos monoterpénicos do tipo hidrocarboneto — colocados nos tempos de retenção (tanto na primeira como na segunda dimensão) mais baixos (maior volatilidade e menor polaridade);
2. compostos monoterpénicos oxigenados — colocados nos tempos de retenção que na primeira dimensão são superiores aos tempos de retenção dos compostos monoterpénicos do tipo hidrocarboneto (menor volatilidade do que os compostos anteriores) e que na segunda dimensão são superiores aos tempos de retenção dos compostos monoterpénicos do tipo hidrocarboneto (maior polaridade do que os compostos anteriores). Verificou-se que estes compostos também se agrupam em álcoois, aldeídos/cetonas e ésteres.
3. compostos sesquiterpénicos do tipo hidrocarboneto — colocados nos tempos de retenção que na primeira dimensão são superiores aos tempos de retenção dos compostos monoterpénicos (do tipo hidrocarboneto e oxigenados), o que implica menor volatilidade relativamente a estes mesmos compostos, e que na segunda dimensão são mais baixos (menor polaridade);
4. compostos sesquiterpénicos oxigenados — colocados nos tempos de retenção (tanto na primeira como na segunda dimensão) mais altos (menor volatilidade e maior polaridade);

4. Resultados e discussão

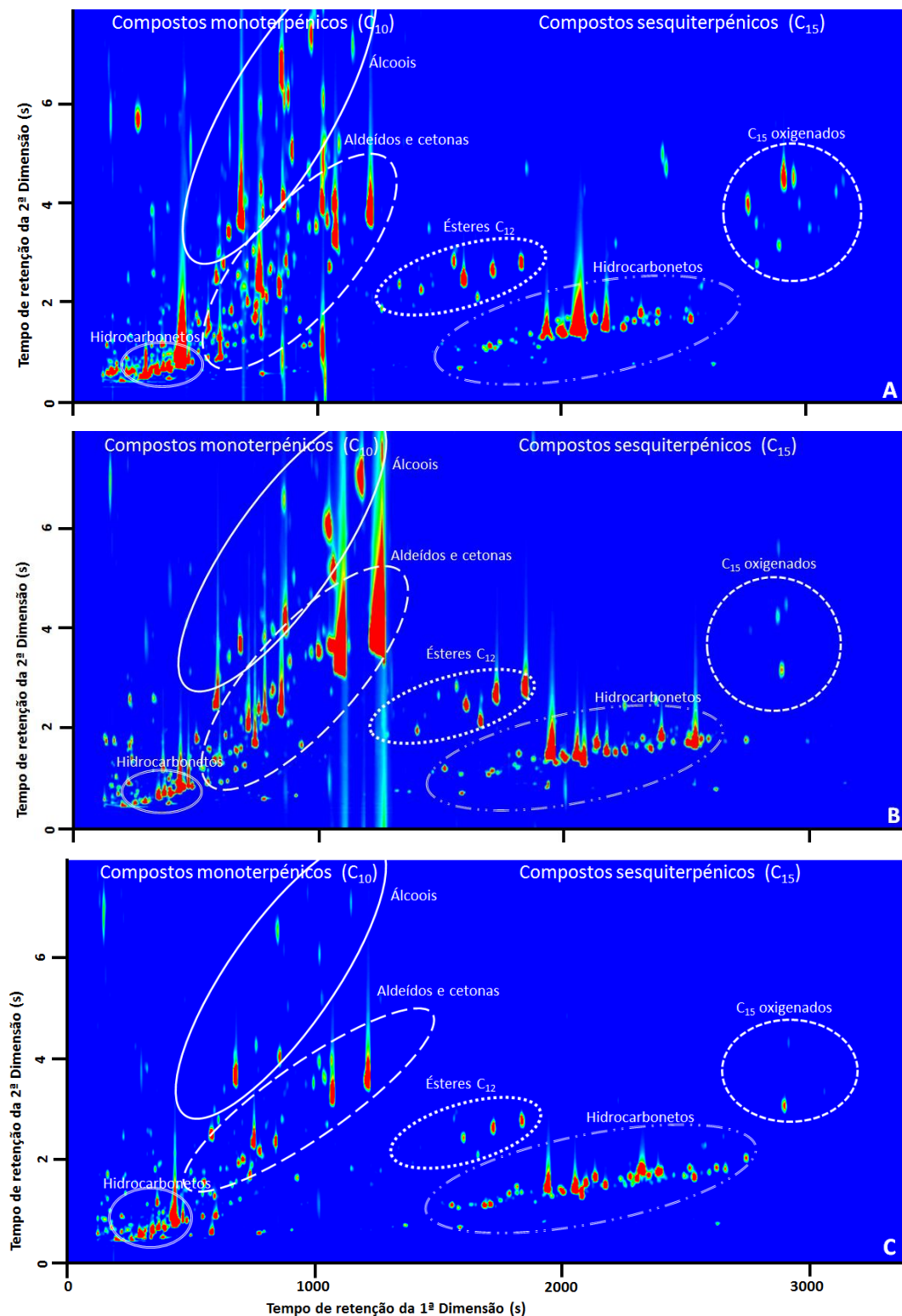


Figura 24 — Diagramas de contornos do GC × GC-ToFMS, em corrente total de iões, referentes às folhas secas de *Eucalyptus globulus* L. (A), *Citrus limon* L. (B) e *Hypericum androsaemum* L. (C) mostrando a distribuição de classes de compostos em diferentes regiões do espaço cromatográfico.

4. Resultados e discussão

Analisando a figura 24 verifica-se que o *E. globulus* L. apresenta um maior número de compostos e que o *H. androsaemum* L. apresenta um número de compostos em menor número, o que vai ao encontro dos resultados obtidos num trabalho anterior [27]. No que diz respeito à área cromatográfica observa-se que no caso do *C. limon* L. esta é maior quando para o *H. androsaemum* L. é menor. Observando o diagrama de contornos relativo ao *E. globulus* L. verifica-se que os compostos terpénicos em C_{10} são em menor número do que os compostos terpénicos em C_{15} e que a área cromatográfica tem um comportamento semelhante. Relativamente aos compostos terpénicos em C_{15} os compostos do tipo hidrocarboneto encontram-se em maior número e também numa maior área cromatográfica comparativamente aos compostos terpénicos em C_{15} oxigenados, o que era expectável uma vez que o mesmo já tinha sido descrito na literatura [27]. Relativamente ao diagrama de contornos do *C. limon* L. verifica-se que o grupo dos compostos monoterpénicos é mais representativo quando comparado ao grupo dos compostos sesquiterpénicos. Dos compostos monoterpénicos os que contêm oxigénio são mais evidentes. Já no grupo dos compostos C_{15} os hidrocarbonetos destacam-se relativamente aos oxigenados, quer em número de compostos quer em termos de área cromatográfica. Resultados semelhantes foram reportados na literatura [27]. Dentro dos compostos C_{10} oxigenados o grupo dos aldeídos e cetonas é o que apresenta uma maior área cromatográfica, destacando-se duas manchas correspondentes a compostos maioritários nesta amostra. Quando se analisa o diagrama de contornos respeitante ao *H. androsaemum* L. aquilo que foi descrito na literatura [27] é corroborado pois é facilmente perceptível que o grupo dos compostos sesquiterpénicos é mais representativo do que o grupo dos compostos monoterpénicos. Dos compostos terpénicos em C_{15} os hidrocarbonetos destacam-se bastante dos que contêm oxigénio.

A figura 25 mostra o número de compostos terpénicos em C_{10} e C_{15} (do tipo hidrocarboneto e oxigenados), identificados para cada espécie de planta seca em estudo neste trabalho bem como a sua área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a.) e também em termos percentuais.

4. Resultados e discussão

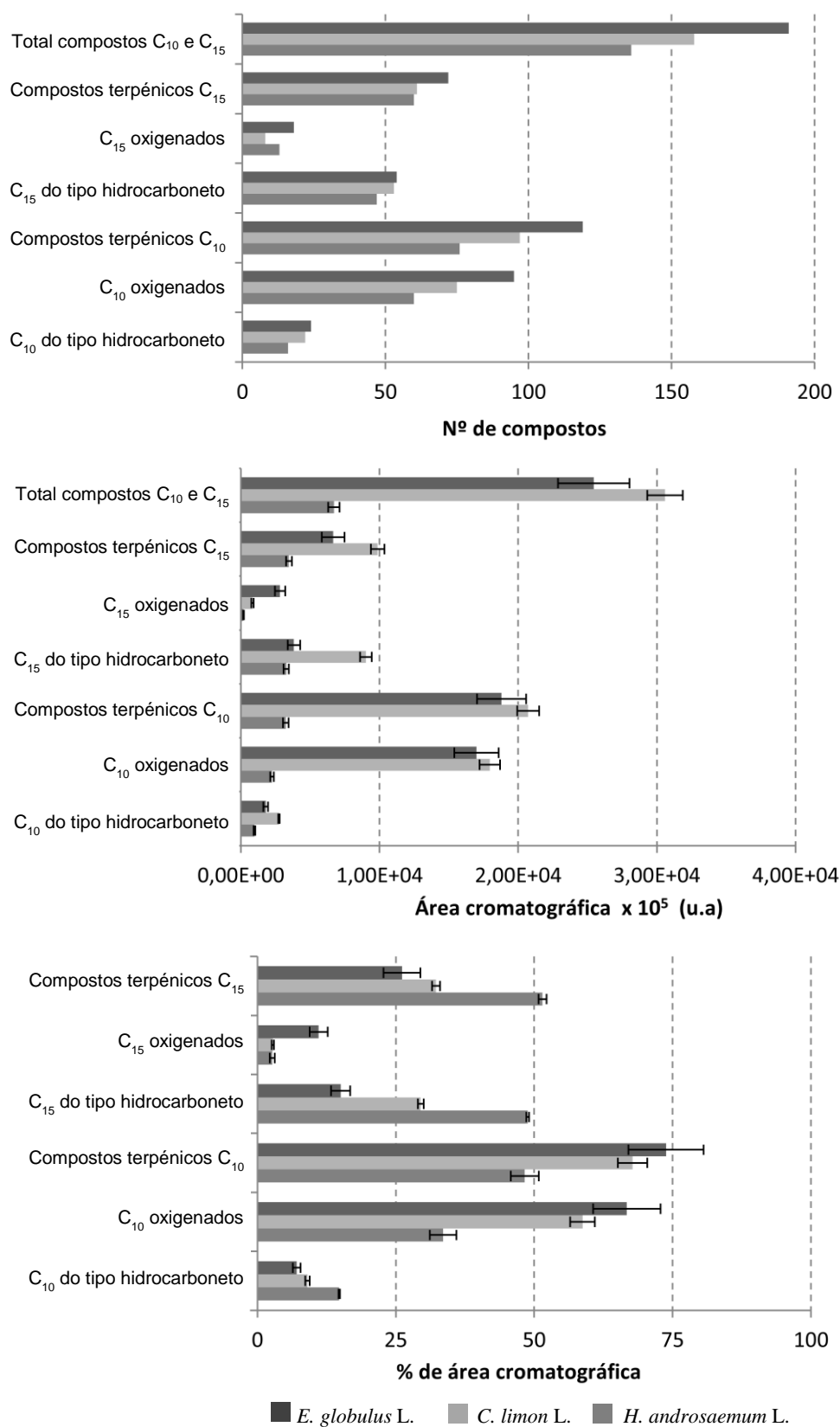


Figura 25 — Gráficos de barras referentes ao número de compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ e à área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a.) e também em percentagem, para cada espécie de planta seca em estudo.

4. Resultados e discussão

Pela análise dos gráficos de barras da figura 25 pode verificar-se que a planta seca que apresenta um maior número de compostos terpénicos, em C₁₀ e C₁₅, é o *E. globulus* L. e a planta seca que apresenta menor número de compostos terpénicos, em C₁₀ e C₁₅, é o *H. androsaemum* L.. No entanto um maior número de compostos não implica uma maior área cromatográfica pois o *C. limon* L. possui menos compostos do que o *E. globulus* L. mas a sua área cromatográfica é superior.

Dos compostos identificados na planta seca de *E. globulus* L. os compostos em maior número são os compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados e são eles que apresentam uma maior área cromatográfica. Dos compostos sesquiterpénicos os do tipo hidrocarboneto encontram-se em número superior aos oxigenados e a sua área cromatográfica também é maior. Nas folhas secas de *C. limon* L. os compostos terpénicos em C₁₀ encontram-se num número superior e numa maior área cromatográfica que aos compostos terpénicos em C₁₅. Dos monoterpenos os compostos oxigenados são em maior número e também em área superior aos não oxigenados. No *H. androsaemum* L. os compostos em maior número são os compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados. Dos compostos terpénicos em C₁₅ os sesquiterpenos não oxigenados encontram-se em maior número. A mesma tendência não se verifica quanto à área cromatográfica. Embora os compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados sejam em maior número aqueles que apresentam uma maior área cromatográfica são os compostos terpénicos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto. De uma forma geral, ou seja, nas espécies em estudo e considerando todas as famílias de compostos, os compostos terpénicos em C₁₀ encontram-se em maior número do que os compostos terpénicos em C₁₅. Dentre os compostos terpénicos em C₁₀ verifica-se que os oxigenados são em maior número, ao contrário do que acontece com o compostos terpénicos em C₁₅, nestes os compostos não oxigenados são em número superior. Quanto à área cromatográfica e para as folhas secas de *E. globulus* L. e *C. limon* L. verifica-se o mesmo, isto é, os compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados apresentam uma maior área cromatográfica. Em relação ao *H. androsaemum* L. os compostos terpénicos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto são os que apresentam uma área cromatográfica superior.

Quando se analisa a figura 25 no que diz respeito à percentagem de área cromatográfica, verifica-se que, no caso do *E. globulus* L., os compostos terpénicos em C₁₀ ocupam uma percentagem superior aos compostos terpénicos em C₁₅. Verifica-se que para o caso do *C. limon* L. acontece o mesmo. Já em relação ao *H. androsaemum* L. acontece o oposto: os

4. Resultados e discussão

compostos terpénicos em C₁₅ apresentam uma percentagem de área cromatográfica superior à dos compostos terpénicos em C₁₀. Nas folhas secas de *E. globulus* L., dentro dos compostos terpénicos em C₁₀ a maior percentagem de área cromatográfica diz respeito a compostos contendo oxigénio (principalmente álcoois). No que toca aos compostos terpénicos em C₁₅ os compostos do tipo hidrocarboneto representam a maior percentagem de área cromatográfica. Quanto às folhas secas de *C. limon* L. tem-se que, dentro dos compostos terpénicos em C₁₀, a maior percentagem de área cromatográfica diz respeito a compostos contendo oxigénio (sobretudo álcoois). No que toca aos compostos terpénicos em C₁₅, a maior percentagem de área cromatográfica diz respeito a compostos do tipo hidrocarboneto. No que se refere às folhas secas de *H. androsaemum* L. observa-se que dos compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ identificados os compostos em C₁₅ apresentam maior percentagem de área cromatográfica. Dentro dos compostos terpénicos em C₁₀, a maior percentagem de área cromatográfica diz respeito a compostos contendo oxigénio mas no que toca aos compostos terpénicos em C₁₅ a maior percentagem de área cromatográfica diz respeito a compostos do tipo hidrocarboneto.

Na tabela 12 encontram-se os compostos terpénicos (em C₁₀ e C₁₅) identificados nas folhas secas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L.. A tabela está organizada de forma semelhante aos diagramas de contornos, isto é, os compostos identificados foram divididos em compostos terpénicos em C₁₀ e compostos terpénicos em C₁₅. Dentro destes dois grupos separaram-se os compostos tendo em conta se possuíam ou não oxigénio e os que possuíam oxigénio foram organizados tendo em conta o seu grupo funcional. Dentro de cada grupo os compostos encontram-se organizados pelo tempo de retenção na primeira coluna. Tendo em conta que aquando do processamento dos dados obtidos por GC × GC-ToFMS se efectuou o cálculo dos índices de retenção estes foram comparados com os valores relatados na literatura para colunas cromatográficas semelhantes à utilizada neste trabalho como coluna de primeira dimensão (HP-5). São apresentados dois valores de R.I. da literatura pois teve-se em conta trabalhos efectuados por cromatografia em fase gasosa unidimensional e também trabalhos onde foi usada cromatografia em fase gasosa bidimensional. As referências para os índices de retenção relatados na literatura são pois mostrados na tabela. Para cada amostra foram efectuadas três réplicas tendo sido calculada a média das áreas e a sua reprodutibilidade expressa como coeficiente de variação (CV).

4. Resultados e discussão

Tabela 12 — Compostos voláteis identificados por GC × GC-ToFMS nas folhas secas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L. (Média da área cromatográfica obtida x 10⁵, expressa em unidades arbitrárias (u.a.)).

								PLANTA SECA					
¹ Dtr (s)	² Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do composto	<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H.androsaemum</i> L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS (C ₁₀)													
C ₁₀ HIDROCARBONETOS													
280	0,52	920	931	[107]	930	[108]	α-tujeno	—	—	52,46	10	VT	—
288	0,63	927	939	[107]	959	[38]	α-pineno	59,34	18	154,86	12	238,44	16
312	0,57	947	953	[107]	959	[109]	Canfeno	60,03	3	52,67	2	85,97	5
312	0,65	947	967	[107]	—	—	Verbeneno	175,44	13	—	—	179,02	5
336	0,63	967	976	[107]	972	[58]	Sabineno	125,86	3	77,98	13	—	—
344	0,62	974	980	[107]	982	[19]	β-pineno	46,62	11	135,53	8	64,71	4
352	0,68	981	—	—	—	—	3,6-dimetileno-1,7-octadieno	VT	—	—	—	—	—
368	0,71	994	991	[107]	995	[38]	β-mirceno	38,43	10	139,57	10	19,18	3
384	0,69	1004	1005	[107]	1016	[108]	α-felandreno	—	—	34,54	5	—	—
384	0,68	1004	1003	[110]	1012	[108]	Pseudolimoneno	157,88	5	—	—	—	—
392	0,67	1008	1011	[107]	1019	[109]	δ-3-careno	21,04	18	104,97	16	7,32	20
416	1,00	1020	1020	[111]	—	—	o-cimeno	256,49	5	93,79	8	126,82	11
416	0,73	1020	1018	[107]	1025	[108]	α-terpineno	13,27	10	62,60	16	—	—
432	0,74	1027	1030	[112]	1038	[113]	β-limoneno	49,75	20	746,02	3	126,50	15
432	1,44	1028	1026	[107]	1027	[58]	p-cimeno	210,40	6	—	—	—	—
464	1,75	1043	1031	[107]	1058	[38]	β-felandreno	2,14	4	83,83	8	90,51	4
464	0,86	1043	1040	[107]	1058	[38]	β-ocimeno (isômero)	83,76	3	81,27	2	19,27	12
472	0,89	1047	1050	[107]	1058	[38]	β-ocimeno (isômero)	215,00	1	192,24	5	16,68	11
488	0,83	1054	1062	[107]	1080	[38]	γ-terpineno	144,58	16	83,83	8	—	—
552	0,92	1085	1088	[107]	1113	[38]	α-terpinoleno	132,96	5	192,24	5	—	—
560	1,23	1089	1134	[50]	—	—	Cosmeno (isômero)	3,68	7	3,34	7	—	—
616	1,30	1110	1111	[107]	1125	[108]	1,3,8-p-mentatrieno	44,28	14	—	—	—	—
616	1,87	1110	—	—	—	—	n.i (<i>m/z</i> 93, 77, 121, 105, 39)	—	—	114,04	12	—	—
624	1,51	1113	1130	[109]	—	—	Dureno	—	—	—	—	5,28	12
640	1,51	1118	1134	[50]	—	—	Cosmeno (isômero)	12,31	12	40,86	7	—	—
664	1,18	1125	1142	[107]	1132	[108]	allo-ocimeno (isômero)	32,50	1	99,33	9	0,96	3
664	1,57	1125	1134	[50]	—	—	Cosmeno (isômero)	34,09	4	119,67	3	4,86	6
696	1,26	1135	1147	[114]	1138	[38]	allo-ocimeno (isômero)	34,92	11	91,97	4	4,58	8
Sub-total								24		22		16	
Área cromatográfica								1,80E+03	10	2,76E+03	2	9,92E+02	6
% Área cromatográfica								7,08	10	9,02	5	14,73	1
C ₁₀ OXIGENADOS													
Alcoois													
504	1,78	1062	1068	[107]	—	—	4-tujanol (isômero)	36,65	1	290,98	11	—	—
512	1,83	1066	1072	[107]	1079	[47]	Dihidro-mircenol	—	—	2,19	5	2,66	9
584	2,55	1101	1098	[107]	1109	[38]	Linalol	146,15	14	746,00	5	192,33	3
616	2,82	1111	1117	[107]	—	—	β-fenchol	281,63	16	24,22	4	42,20	3
632	2,37	1115	1127	[115]	—	—	2-pinanol	3,73	2	—	—	—	—
632	2,52	1115	1117	[116]	1137	[108]	p-ment-2-en-1-ol	—	—	11,66	23	—	—
632	2,66	1115	1097	[107]	1055	[108]	4-tujanol (isômero)	21,03	5	143,80	12	—	—
640	3,43	1118	1140	[107]	—	—	Verbenol (isômero)	221,73	5	95,33	10	26,46	3
672	3,67	1128	1139	[107]	1160	[108]	Pinocarveol	128,55	15	391,95	12	553,02	3
680	4,24	1131	1128	[117]	1138	[108]	p-menta-2,8-dien-1-ol (isômero)	54,19	8	59,91	17	0,36	3
688	4,44	1133	1142	[117]	—	—	p-menta-2,8-dien-1-ol (isômero)	42,95	10	—	—	—	—
704	4,09	1138	1144	[107]	—	—	Verbenol (isômero)	111,11	9	7,93	13	5,07	14
712	2,77	1140	1148	[107]	—	—	Hidrato de canfeno	90,08	13	7,69	10	0,87	1
712	3,30	1140	1159	[118]	—	—	β-terpineol	21,92	6	—	—	—	—
720	4,28	1143	1147	[107]	—	—	Ipsdienol	3,37	7	—	—	—	—
768	4,35	1157	1165	[107]	1198	[47]	Borneol	255,58	9	50,53	2	65,90	1
776	3,81	1160	1189	[107]	1224	[38]	α-terpineol (isômero)	141,96	8	118,65	15	1,51	6
776	1,98	1159	1227	[119]	—	—	3(10)-caren-2-ol	7,86	8	—	—	—	—
792	3,25	1164	1173	[107]	—	—	Mentol	—	—	5,50	4	8,26	3
808	2,70	1169	1177	[107]	1215	[38]	4-terpineol	260,45	15	63,19	11	44,83	2
808	4,01	1170	1189	[118]	—	—	1,8-mentadien-4-ol	47,73	2	77,74	6	0,13	2
840	2,42	1179	—	—	—	—	2-caren-4-ol	265,71	8	—	—	—	—
856	6,73	1185	1185	[117]	—	—	p-menta-1(7),8-dien-2-ol (isômero)	522,29	4	219,60	6	148,53	12
856	4,60	1184	1183	[107]	1213	[38]	p-cimeno-8-ol	49,53	11	—	—	—	—
856	6,98	1185	1135	[120]	—	—	3(10)-caren-4-ol	55,35	15	—	—	—	—
864	4,09	1187	1189	[121]	1224	[38]	α-terpineol (isômero)	356,71	4	743,87	5	56,34	1
864	6,12	1187	1166	[107]	—	—	α-felandren-8-ol	226,55	13	6,91	21	3,75	3
872	4,60	1189	1220	[122]	1205	[19]	Dihidro-carveol (isômero)	24,07	14	—	—	—	—

4. Resultados e discussão

								PLANTA SECA					
								<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H.androsaemum</i> L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
¹ Dtr (s)	² Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do composto						
COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS (C ₁₀) (cont.)													
C ₁₀ OXIGENADOS (cont.)													
Álcoois (cont.)													
880	3,33	1191	1156	[123]	—	—	Isopulegol	45,55	10	163,65	7	23,86	6
880	6,18	1192	1194	[107]	1237	[38]	Mirtenol	389,62	4	16,72	19	20,85	13
896	5,20	1197	1217	[107]	1246	[108]	Carveol (isômero)	383,54	3	77,03	11	25,32	20
920	4,55	1203	—	—	—	—	n.i. (m/z = 39, 91, 84, 77)	—	—	17,96	17	—	—
968	4,68	1213	1229	[107]	1261	[108]	Carveol (isômero)	145,33	17	54,73	11	5,73	12
976	7,39	1215	—	—	—	—	2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol	635,14	1	18,77	4	21,87	8
1000	5,76	1220	—	—	—	—	7-metil-3-metileno-6-octen-1-ol	—	—	11,64	6	—	—
1024	6,07	1225	1228	[107]	1245	[38]	Geraniol (isômero)	124,73	3	1752,09	3	0,23	3
1024	4,91	1225	1240	[117]	—	—	p-menta-1(7),8-dien-2-ol (isômero)	268,40	3	—	—	—	—
1032	5,21	1227	1228	[121]	1234	[38]	β-citronelol	49,25	14	944,77	14	1,42	7
1144	7,25	1252	1255	[107]	1265	[38]	Geraniol (isômero)	70,02	9	1715,49	8	80,56	1
1360	7,33	1298	1252	[107]	—	—	Mirtanol (isômero)	38,53	15	—	—	—	—
1424	7,83	1310	1258	[107]	—	—	Mirtanol (isômero)	21,78	6	—	—	—	—
Sub-total								37		29		24	
Área cromatográfica								5,41E+03	5	7,84 E+03	3	133 E+03	1
% Área cromatográfica								21,24	4	25,64	2	19,87	5
Aldeídos													
576	1,36	1097	—	—	—	—	2-etilideno-6-metil-3,5-heptadienal	34,67	1	—	—	—	—
648	1,88	1120	1125	[107]	1133	[19]	α-canfolenal	237,55	12	14,02	12	4,22	2
736	1,72	1147	1153	[107]	—	—	β-citronelal	38,28	2	158,47	13	7,47	4
872	2,86	1189	1193	[107]	—	—	Mirtenal	257,98	14	24,33	21	8,04	1
880	3,06	1191	1201	[124]	1223	[47]	Safranal	—	—	—	—	4,43	8
968	3,54	1213	—	—	—	—	3-caren-10-al	74,33	14	160,34	2	—	—
1048	4,95	1230	1239	[107]	—	—	Cuminal	33,07	6	—	—	—	—
1064	3,33	1234	1240	[107]	1265	[38]	Citral (isômero)	1335,66	6	1754,14	5	55,52	13
1192	4,46	1261	1271	[107]	—	—	Perila aldeído	15,92	3	22,79	5	—	—
1200	3,78	1263	1270	[107]	1287	[38]	Citral (isômero)	1111,35	11	3331,16	3	81,13	10
Sub-total								9		7		6	
Área cromatográfica								3,13E+03	5	5,47E+03	3	1,61E+02	9
% Área cromatográfica								12,27	3	17,88	4	2,40	9
Cetonas													
544	1,35	1081	1094	[125]	1106	[108]	Fenchona	—	—	1,07	8	40,49	17
616	1,54	1110	1114	[126]	—	—	β-tujona	34,52	7	—	—	7,83	3
696	1,97	1135	1143	[107]	1174	[47]	Cânfora	13,62	11	—	—	180,20	7
696	2,36	1135	—	—	—	—	2-metil-6-metileno-1,7-octadien-3-ona	94,63	2	9,23	3	VT	—
720	1,60	1142	1164	[107]	—	—	Isomentona	—	—	—	—	22,49	21
752	1,98	1152	1160	[107]	—	—	Pinocanfona (isômero)	277,95	8	5,91	20	0,74	10
752	2,29	1152	1162	[107]	1181	[108]	Pinocarvona	547,65	5	245,91	8	46,15	7
792	2,10	1164	1173	[107]	—	—	Pinocanfona (isômero)	164,06	13	9,01	5	52,87	3
880	2,61	1191	1193	[107]	1218	[108]	Dihidrocarvona (isômero)	58,10	5	5,24	8	3,78	19
904	2,78	1198	1200	[107]	1224	[108]	Dihidrocarvona (isômero)	24,15	10	3,83	11	0,32	6
920	3,77	1203	1204	[107]	1235	[47]	Verbenona	128,78	7	8,32	2	2,81	16
1072	3,68	1235	1242	[107]	1281	[47]	Carvona	642,54	8	109,05	14	35,38	7
1080	3,14	1237	1256	[127]	—	—	Carvotanacetona	15,87	9	—	—	VT	—
1112	3,69	1244	1282	[118]	1277	[108]	Piperitona	47,34	7	70,79	13	0,17	6
1120	3,46	1246	1252	[107]	1277	[108]	Carvenona	4,82	12	—	—	—	—
Sub-total								13		10		14	
Área cromatográfica								2,05E+03	3	4,68E+02	1	3,93E+02	7
% Área cromatográfica								8,07	4	1,53	2	5,86	2
Óxidos/epóxidos													
368	0,80	994	988	[38]	1006	[38]	Herbóxico	52,81	8	—	—	5,10	14
384	0,79	1004	—	—	—	—	2,3-epoxicarano	86,36	2	11,39	3	6,49	3
512	1,63	1066	1074	[107]	1080	[108]	Óxido de linalol (isômero)	96,94	3	9,47	11	29,32	16
552	1,82	1086	1089	[107]	1090	[108]	Óxido de linalol (isômero)	62,37	6	8,38	8	24,00	10
560	1,51	1089	1095	[128]	—	—	Óxido de α-pineno	97,83	13	—	—	0,54	19
608	1,12	1108	1113	[38]	1128	[38]	Óxido de rosa	2,81	9	—	—	0,87	7
664	1,54	1125	1134	[118]	1145	[108]	Óxido de limoneno (isômero)	27,52	13	49,84	2	2,63	9
688	1,61	1132	1134	[118]	1149	[108]	Óxido de limoneno (isômero)	32,13	10	85,36	2	2,51	18
704	1,65	1137	1138	[129]	1156	[108]	Epoxi-terpinoleno	—	—	5,60	3	—	—
704	1,80	1137	—	—	—	—	Epoxi-ocimeno	7,59	10	14,47	12	—	—
744	1,64	1149	1153	[107]	1172	[38]	Óxido de nerol	95,87	2	—	—	VT	—
848	2,20	1181	—	—	—	—	3,9-epoxi-p-menta-1,8(10)-dieno	185,65	7	—	—	—	—
992	3,56	1218	—	—	—	—	2,3-epoxicitral (isômero)	203,13	1	531,35	13	1,70	7

4. Resultados e discussão

								PLANTA SECA					
								<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H.androsaemum</i> L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
¹ Dtr (s)	² Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do composto						
COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS (C ₁₀) (cont.)													
Óxidos/epóxidos (cont.)													
1040	3,70	1228	—	—	—	—	2,3-epoxicitral (isômero)	242,47	1	—	—	—	—
Sub-total								13		8		10	
Área cromatográfica								1,04E+03	24	7,16E+02	10	7,55E+01	13
% Área cromatográfica								4,09	232,34	2,34	9	1,12	7
C ₁₀ OXIGENADOS (cont.)													
Éteres													
3,68	0,73	994	991	[107]	—	—	2,3-dehidro-1,8-cineol	14,18	38	—	—	—	—
432	0,77	1027	1033	[107]	1061	[38]	1,8-cineole	3310,35	9	3,70	7	188,79	3
832	5,88	1177	—	—	—	—	4-hidroxi-1,8-cineole	7,45	6	—	—	—	—
920	4,18	1203	1228	[130]	—	—	exo-2-hidroxi-1,8-cineole	28,60	7	—	—	—	—
Sub-total								4		1		1	
Área cromatográfica								3,36E+03	9	3,70E+00	7	1,89E+02	3
% Área cromatográfica								13,21	10	0,01	6	2,82	5
Outros													
576	1,38	1093	1116	[131]	—	—	Rosefurano	—	—	161,79	11	—	—
1488	2,68	1321	—	—	1353	[38]	Ácido gerânico	7,00	8	42,06	20	—	—
Sub-total								1		2		—	
Área cromatográfica								7,00E+00	8	1,99 E+02	9	—	—
% Área cromatográfica								0,03	6	0,64	7	—	—
ÉSTERES (C ₁₁ , C ₁₂ e C ₁₃)													
968	1,45	1214	1223	[132]	—	—	Acetato de α-fenchilo	38,55	4	—	—	—	—
1144	1,87	1250	—	—	—	—	Formato de linalilo	—	—	—	—	28,09	12
1264	1,90	1280	1285	[107]	—	—	Acetato de borneol (isômero)	78,02	11	16,54	10	15,54	11
1264	2,29	1276	1275	[107]	—	—	Formato de citronelilo	—	—	8,63	20	—	—
1264	1,90	1276	1285	[107]	—	—	Acetato de borneol (isômero)	78,02	11	—	—	—	—
1280	2,76	1280	1300	[107]	—	—	Formato de gerânio	—	—	7,15	22	—	—
1288	2,27	1285	1257	[107]	—	—	Acetato de linalol	27,79	2	7,43	9	—	—
1336	2,40	1294	1298	[133]	—	—	Acetato de 4(10)-tujen-3-ol	108,57	2	6,43	22	VT	—
1376	3,01	1301	1307	[134]	—	—	Formato de nerilo	—	—	9,47	19	—	—
1416	2,71	1416	1325	[133]	—	—	Acetato de mirtenilo	12,36	8	—	—	—	—
1424	2,29	1310	1305	[107]	—	—	Acetato de dihidrocarveol	156,28	9	9,98	18	—	—
1464	2,58	1316	1295	[135]	—	—	Acetato de pinocarvilo	17,90	12	—	—	—	—
1560	2,85	1333	—	—	—	—	Acetato de exo-2-hidroxi-1,8-cineole	229,19	20	89,01	15	VT	—
1568	3,10	1335	1337	[107]	—	—	Acetato de carvilo (isômero)	24,78	11	—	—	—	—
1600	2,57	1340	1352	[136]	1359	[108]	Acetato de terpenilo	527,48	7	353,01	17	79,77	8
1648	3,36	1349	1362	[107]	—	—	Acetato de carvilo (isômero)	7,72	5	—	—	—	—
1656	2,13	1350	1354	[107]	1354	[108]	Acetato de citronelilo	128,77	1	386,88	11	—	—
1664	2,60	1352	1289	[107]	—	—	Acetato de lavandulilo	—	—	17,22	24	—	—
1720	2,69	1363	1365	[107]	1379	[108]	Acetato de nerilo	445,46	8	749,28	9	—	—
1840	2,82	1383	1383	[107]	1386	[108]	Acetato de gerânio	458,05	3	1346,12	10	—	—
2184	2,01	1441	1444	[107]	—	—	Propionato de citronelilo	—	—	10,22	9	—	—
2248	2,45	1452	1454	[107]	—	—	Propionato de nerilo	9,01	6	99,67	25	—	—
2376	2,57	1473	1475	[107]	—	—	Propionato de gerânio	4,91	7	113,44	16	—	—
Sub-total								17		17		5	
Área cromatográfica								2,00E+03	29	3,24E+03	8	1,00E+02	64
% Área cromatográfica								7,83	28	10,59	5	1,46	61
Nº de compostos monoterpênicos oxigenados								94		74		60	
Área cromatográfica								1,70E+04	5	1,79 E+04	2	2,25 E+03	5
% Área cromatográfica								66,73	4	58,70	0	33,53	2
Nº de compostos terpênicos em C ₁₀								118		96		76	
Área cromatográfica								1,88E+04	5	2,07E+04	2	3,24E+03	5
% Área cromatográfica								73,82	4	67,73	1	48,29	1
COMPOSTOS SESQUITERPÊNICOS (C ₁₅)													
C ₁₅ HIDROCARBONETOS													
1512	1,20	1325	1316	[129]	—	—	Bicicloelemeno	12,28	15	133,26	17	6,11	12
1552	1,14	1332	1351	[107]	1355	[19]	α-longipineno	4,58	2	—	—	157,17	1
1576	1,08	1336	1351	[107]	1354	[137]	α-cubebeno	19,53	11	46,19	4	29,33	20
1648	1,16	1349	1368	[107]	1382	[108]	Ciclo-sativeno	13,18	9	—	—	48,03	20
1680	1,13	1355	1373	[138]	1372	[19]	α-ilangeno	34,06	14	—	—	146,89	11
1688	1,26	1356	—	—	—	—	n.i. (m/z 41, 91, 119, 105, 79, 55)	—	—	—	—	5,31	1
1696	1,08	1357	—	—	—	—	n.i. (m/z 105, 91, 119, 161)	—	—	87,12	24	—	—
1704	1,17	1359	1376	[107]	1377	[137]	α-copaeno	60,86	5	101,42	20	176,59	8

4. Resultados e discussão

¹Dtr (s)								²Dtr (s)		R.I. calc. ^a		R.I. lit. ^b (1D)		Ref.		R.I. lit. ^c (2D)		Ref.		Nome do composto		PLANTA SECA							
																						E. globulus L.		C. limon L.		H.androsaemum L.			
																						Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV		
COMPOSTOS SESQUITERPÊNICOS (C ₁₅) (cont.)																													
C ₁₅ HIDROCARBONETOS (cont.)																													
1728	1,11	1363	—	—	—	—	n.i. (m/z 105, 91, 119, 41, 77)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1752	1,23	1367	1385	[107]	1397	[108]	β-bourboneno	65,02	3	4,51	17	32,30	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1776	1,28	1372	1396	[139]	—	—	α-cloveno (isômero)	—	—	—	—	2,60	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1776	1,47	1372	1375	[107]	1393	[137]	β-elemenno (isômero)	—	—	14,13	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1800	1,27	1376	—	—	—	—	n.i. (m/z 91, 105, 161, 119)	48,01	8	43,38	5	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1816	1,50	1379	1375	[107]	1393	[137]	β-elemenno (isômero)	20,90	4	127,38	20	54,62	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1832	1,40	1382	1402	[107]	1398	[58]	α-longifoleno	4,50	9	—	—	31,24	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1872	1,40	1389	1404	[107]	—	—	γ-cariofileno	53,92	2	67,69	8	4,96	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1880	1,37	1390	1409	[107]	—	—	α-cedreno	VT	—	—	—	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1888	1,20	1392	1373	[126]	1380	[108]	Isoledeno (isômero)	17,14	6	12,06	12	8,39	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1904	1,14	1395	1380	[140]	—	—	Ledano	39,39	17	8,02	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1912	1,34	1396	1430	[111]	1441	[108]	γ-elemenno	—	—	—	—	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1920	1,34	1397	1426	[141]	1456	[108]	Tujopseno	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1928	1,36	1399	1409	[107]	1421	[108]	α-gurjuneno	33,88	11	31,65	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1936	1,47	1400	1418	[107]	1424	[19]	β-cariofileno	689,55	4	2149,06	10	699,69	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1952	1,38	1403	—	—	—	—	n.i. (m/z 107, 79, 91, 122)	56,01	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1952	1,76	1403	—	—	—	—	δ-panasinsino	—	—	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1960	1,31	1404	1436	[107]	1439	[137]	α-bergamoteno (isômero)	61,67	15	65,09	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1984	1,32	1408	1420	[107]	1431	[108]	α-santaleno	VT	—	16,78	9	5,35	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1984	1,67	1408	—	—	1365	[108]	8,9-dehidro-neo-isolongifoleno	51,60	10	4,10	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1992	1,48	1410	1439	[107]	1446	[108]	α-guaiano	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2000	1,39	1411	1432	[107]	1446	[108]	β-gurjuneno	92,56	1	237,35	5	66,24	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2024	1,72	1415	—	—	—	—	n.i. (m/z 91, 131, 105, 41)	83,27	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2048	1,45	1419	1439	[107]	1485	[137]	Aromadendreno	110,43	4	477,12	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2064	1,41	1421	1385	[142]	—	—	β-panasinseno	—	—	23,41	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2072	1,50	1423	—	—	1405	[108]	Sativeno	—	—	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2080	1,41	1423	1436	[107]	1492	[137]	α-bergamoteno (isômero)	VT	—	625,22	0	7,07	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2096	1,54	1427	1458	[143]	—	—	Aristoleno	51,85	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2096	1,69	1427	—	—	—	—	9,10-dehidro-isolongifoleno	1,78	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2128	1,77	1432	—	—	—	—	β-vatirenenno	57,94	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2136	1,71	1433	1455	[121]	—	—	α-cariofileno	51,66	14	579,28	10	354,33	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2136	1,54	1433	1449	[107]	—	—	β-santaleno (isômero)	—	—	13,15	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2168	1,55	1438	1461	[107]	1460	[19]	allo-aromadendreno	76,44	2	322,50	0	345,78	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2184	1,72	1441	—	—	—	—	Dihidrocurcumeno	—	—	—	—	2,37	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2192	1,64	1442	1480	[107]	1481	[137]	Germacreno D	—	—	2,68	14	4,82	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2216	1,52	1446	1462	[132]	1432	[108]	β-santaleno (isômero)	11,36	8	148,06	3	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2232	1,67	1449	—	—	—	—	n.i. (m/z 105, 91, 41, 79)	—	—	—	—	2,37	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2240	1,65	1450	1447	[107]	1455	[19]	α-himachaleno	—	—	—	—	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2248	1,58	1452	1443	[107]	1455	[137]	β-farneseno (isômero)	18,60	4	236,85	7	11,90	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2256	1,54	1453	1473	[107]	1490	[108]	γ-gurjuneno	166,27	7	62,84	12	VT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2280	1,60	1457	1438	[144]	—	—	γ-selineno	—	—	—	—	15,12	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2296	1,65	1460	1485	[126]	1509	[137]	α-amorfeno	174,02	5	50,24	23	64,34	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2320	1,83	1464	1485	[107]	—	—	β-selineno	149,61	14	112,17	18	388,43	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2328	1,83	1464	—	—	—	—	n.i. (m/z 79, 93, 105, 41, 67)	270,64	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2336	1,65	1466	1450	[145]	—	—	Dehidroaromadendreno	25,20	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2344	1,63	1467	1499	[107]	—	—	β-himachaleno	—	—	30,06	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2360	1,58	1470	1458	[107]	1455	[137]	β-farneseno (isômero)	12,63	13	180,09	21	2,14	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2360	1,81	1470	1454	[107]	1468	[108]	α-cloveno (isômero)	27,02	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2368	2,15	1471	1483	[107]	1495	[108]	α-curcumeno	—	—	19,45	12	3,54	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2384	1,81	1474	1494	[107]	1513	[108]	α-selineno	—	—	—	—	31,19	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2384	1,62	1474	1472	[110]	—	—	β-cadineno	—	—	VT	—	6,10	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2392	1,63	1475	1493	[107]	—	—	Ledeno	73,22	7	54,22	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2400	1,83	1477	1494	[146]	1513	[108]	Biciclogermacreno	146,41	9	730,67	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2440	1,96	1483	1502	[146]	—	—	Germacreno A	—	—	13,45	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2448	1,74	1485	1480	[144]	1481	[137]	α-muroleno	14,77	17	74,22	16	26,58	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2464	2,01	1487	—	—	—	—	n.i. (m/z 91, 105, 133, 41)	—	—	24,81	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2504	1,73	1494	1511	[147]	1																								

4. Resultados e discussão

								PLANTA SECA					
1 ^o Dtr (s)	2 ^o Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do composto	<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H.androsaemum</i> l.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
C ₁₅ hidrocarbonetos (cont.)													
2616	1,90	1512	1491	[107]	1507	[108]	Valenceno	—	—	—	—	114,82	18
2624	1,92	1513	1532	[107]	—	—	α -cubeneno	2,34	9	7,29	11	—	—
2648	2,53	1517	—	—	—	—	n.i. (<i>m/z</i> 145, 131, 187)	—	—	—	—	14,41	7
2656	1,96	1518	1538	[107]	1542	[137]	α -cadineno	—	—	7,91	11	15,30	14
2656	2,13	1518	—	—	—	—	n.i. (<i>m/z</i> 91, 41, 57, 85, 119)	4,47	4	—	—	—	—
2664	1,74	1520	1515	[141]	1523	[108]	γ -bisaboleno	—	—	20,44	22	—	—
2680	2,92	1522	1540	[149]	1552	[137]	α -calacoreno	—	—	—	—	5,84	18
2736	2,11	1531	1560	[118]	1578	[108]	Germacreno B	—	—	—	—	49,76	11
2744	1,76	1532	1511	[132]	1536	[19]	α -bisaboleno(isômero)	4,95	3	122,45	10	—	—
Sub-total								54		53		47	
Área cromatográfica								3,83E+03	12	9,02E+03	5	3,28E+03	6
% Área cromatográfica								15,04	12	29,51	2	48,83	1
C ₁₅ OXIGENADOS													
Álcoois													
2768	4,00	1537	1532	[126]	—	—	Epiglobulol	435,01	11	3,61E+01	20	25,90	15
2800	2,80	1542	1567	[150]	1593	[108]	Palustrol	84,80	9	—	—	—	—
2800	3,61	1542	—	—	—	—	n.i. (<i>m/z</i> 43, 91, 81, 105, 67)	104,46	13	—	—	—	—
2808	3,72	1543	—	—	—	—	n.i. (<i>m/z</i> 59, 107, 91, 79, 121)	7,85	12	—	—	—	—
2872	4,25	1553	1574	[107]	—	—	Germacreno D-4-ol	—	—	8,02E+01	23	—	—
2880	5,62	1555	1576	[107]	1576	[137]	Espatulanol	25,85	10	5,95E+01	24	0,55	7
2920	4,48	1561	1576	[107]	1599	[19]	Globulol	424,96	3	6,21E+01	4	7,92	12
2952	4,55	1566	1590	[107]	—	—	Viridiflorol	293,05	9	1,28E+01	7	VT	—
2976	4,00	1570	1595	[138]	1617	[108]	Guaiol	61,89	16	—	—	VT	—
3016	3,52	1576	1565	[122]	1593	[108]	Ledol	65,79	13	—	—	VT	—
3024	4,72	1578	1599	[151]	—	—	Rosifoliol	44,66	3	—	—	VT	—
3120	4,97	1593	1564	[107]	1556	[19]	Nerolidol	—	—	2,54E+01	4	—	—
3128	4,25	1594	—	—	—	—	n.i. (<i>m/z</i> 39, 91, 79, 105, 55)	80,26	9	—	—	—	—
3160	4,46	1599	1649	[107]	1646	[137]	β -eudesmol	58,72	8	—	—	VT	—
Sub-total								12		6		8	
Área cromatográfica								1,69E+03	5	2,76E+02	8	2,49E+01	88
% Área cromatográfica								6,63	6	0,90	6	0,37	86
Óxidos/epóxidos													
1952	1,48	1403	—	—	—	—	Calareno epóxido	7,83	3	—	—	—	—
2048	1,54	1419	1399	[152]	—	—	Longipineno epóxido	807,35	12	341,06	10	VT	—
2272	1,96	1456	—	—	—	—	α -cedreno epóxido	—	—	—	—	VT	—
2896	3,17	1557	1606	[107]	1582	[19]	Óxido de cariofileno	109,61	11	226,42	12	151,76	5
2912	4,56	1560	—	—	—	—	α -bisaboleno epóxido	VT	—	—	—	—	—
3152	3,32	1598	1646	[145]	—	—	Óxido de <i>allo</i> -aromadendreno	8,93	7	—	—	—	—
Sub-total								5		2		3	
Área cromatográfica								1,12E+03	25	5,67E+02	10	1,55E+02	2
% Área cromatográfica								4,43	27	1,85	8	2,31	6
Cetonas													
2272	1,96	1456	—	—	—	—	Canferenona	—	—	—	—	5,50	18
3056	3,50	1583	—	—	—	—	Humuladienona	20,26	6	—	—	8,08	15
Sub-total								1		—		2	
Área cromatográfica								2,03E+01	6	—	—	1,36E+01	4
% Área cromatográfica								0,08	4	—	—	0,20	2
Nº de compostos sesquiterpênicos oxigenados								18		8		13	
Área cromatográfica								2,83E+03	13	8,44 E+02	9	1,93 E+02	10
% Área cromatográfica								11,14	14	2,76	6	2,88	10
Nº de compostos terpênicos em C ₁₅								72		61		60	
Área cromatográfica								6,66E+03	10	9,87E+03	5	3,47E+03	6
% Área cromatográfica								26,18	10	32,27	2	51,71	1
TOTAL DE COMPOSTOS TERPÊNICOS EM C ₁₀ e C ₁₅								190		157		136	
TOTAL DE ÁREA CROMATOGRÁFICA								2,55E+04	2	3,06 E+04	3	6,71E+03	5

Notas:

a → índices de retenção calculados usando a série de alcanos C₈-C₂₀; b → índices de retenção referidos na literatura para colunas HP-5 ou equivalentes usando cromatografia em fase gasosa unidimensional; c → índices de retenção referidos na literatura para colunas HP-5 ou equivalentes usando cromatografia em fase gasosa bidimensional; n.i. → não identificado; — → ausente na amostra; VT → vestigial (presente apenas numa das 3 réplicas); Ref. → indicação da referência bibliográfica.

4. Resultados e discussão

No que diz respeito ao índice de retenção (R.I.) absoluto verifica-se uma diferença máxima de 50, o que corresponde a uma percentagem inferior a 5% o que indica que os valores de R.I. calculados são similares aos R.I. referidos na literatura (como se pode observar na tabela 12). Quanto ao CVs verifica-se que para as plantas secas este é, na maior parte dos casos, inferior a 20%. Este valor é devido à variabilidade intrínseca e natural das folhas. Os CVs mais elevados verificaram-se sobretudo em compostos que foram detectados apenas em duas réplicas.

Verifica-se, pela análise da tabela 12, que os monoterpenos do tipo hidrocarboneto se localizam na 1ª dimensão entre os 280 e os 696 segundos e na segunda dimensão entre os 0,52 e os 1,87 segundos. Verifica-se que na gama em que se encontram os monoterpenos do tipo hidrocarboneto também aparecem compostos pertencentes a outras famílias como é o caso do éter 1,8-cineole, de vários óxidos e epóxidos — herbóxido; 2,3-epoxicarano; isómeros do óxido de linalol; óxido de α -pineno; óxido de rosa; isómeros do óxido de limoneno — da cetona fenchona e do furano rosefurano. Os monoterpenos contendo oxigénio, pertencentes à família dos álcoois, localizam-se na primeira dimensão entre os 504 e os 1424 segundos e na segunda dimensão entre os 1,78 e os 7,83 segundos. Observando a figura 27, referida anteriormente, é possível verificar que esta família ocupa uma região bastante extensa dos diagramas de contornos. Dos monoterpenos contendo oxigénio os aldeídos e as cetonas começam a ser identificados no tempo de retenção 544; 1,35 segundos e o último composto a ser identificado ocorre aos 1200; 3,78 segundos. Os éteres 4-hidroxi-1,8-cineole e exo-2-hidroxi-1,8-cineole, sendo bastante polares, aparecem na segunda dimensão com tempos de retenção elevados, 5,88 e 4,18 segundos respectivamente, ao contrário do 1,8-cineole que aparece aos 0,77 segundos. Os compostos monoterpénicos esterificados são identificados a partir dos 968; 1,45 segundos até 2376; 2,57 segundos. Deste grupo fazem parte os formatos (11 carbonos) bem como os acetatos (12 carbonos) e os proprionatos (13 carbonos) sendo que geralmente aparecem por esta ordem, devido ao número de carbonos que influencia a sua volatilidade. Os compostos terpénicos em C₁₅, não contendo oxigénio, começam a ser identificados a partir dos 512; 1,20 segundos até ao tempo de retenção 2744; 1,76. O primeiro sesquiterpeno oxigenado a ser identificado aparece aos 1952; 1,48 segundos e o último é identificado aos 3160; 4,46 segundos.

4. Resultados e discussão

Num trabalho anterior [27] as folhas secas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L. foram analisadas por HS-SPME/GC-qMS tendo sido identificados 68, 59 e 29 compostos, respectivamente, um número bastante menor ao obtido no presente trabalho (190, 157 e 136 compostos para o *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L., respectivamente) no qual as amostras foram analisadas por HS-SPME/GC \times GC-ToFMS e assim pode-se afirmar que o uso desta técnica permitiu atingir o objectivo de determinar o perfil metabólico das plantas secas, com base na composição em compostos mono e sesquiterpénicos, tendo-se identificado mais compostos.

Na figura 26 encontram-se os gráficos de barras referentes a alguns dos compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ identificados nas folhas secas das plantas *Eucalyptus globulus* L. e *Citrus limon* L. e na amostra comercial de *Hypericum androsaemum* L., respectivamente, em função da área cromatográfica (expressa em unidades arbitrárias – u.a.). Tendo em conta que foram identificados muitos compostos apresentam-se apenas aqueles cuja área cromatográfica é superior a 500×10^5 (u.a.).

Pelos dados da tabela 12 e pela observação da figura 26 (A) verifica-se que nas folhas secas da planta *E. globulus* L. os compostos maioritários são: 1,8-cineole ($3310,35 \times 10^5$) e os isómeros do citral ($1335,66 \times 10^5$ e $1111,35 \times 10^5$). Na literatura os resultados não são exactamente os mesmos, o composto relatado como sendo o mais abundante foi o *allo*-aromadendreno seguido pelo 1,8-cineole, limoneno, α -pineno, aromadendreno e *p*-cimeno [27]. Estas diferenças podem ser explicadas pelo facto de as folhas usadas nesse trabalho e aquelas usadas no trabalho presente terem sido cultivadas em zonas geográficas diferentes e colhidas em anos e épocas do ano diferentes. Através da figura 26 (B) é possível observar que nas folhas secas da planta de *C. limon* L. o composto maioritário é um dos isómeros do citral ($3331,16 \times 10^5$). O β -cariofileno ($2149,06 \times 10^5$), o outro isómero do citral ($1754,14 \times 10^5$), os isómeros do geraniol ($1752,09 \times 10^5$ e $1715,49 \times 10^5$) e o acetato de geranilo ($1346,12 \times 10^5$) também apresentam concentrações bastante elevadas. Verifica-se que a maior parte dos destes compostos são monoterpenos oxigenados.

4. Resultados e discussão

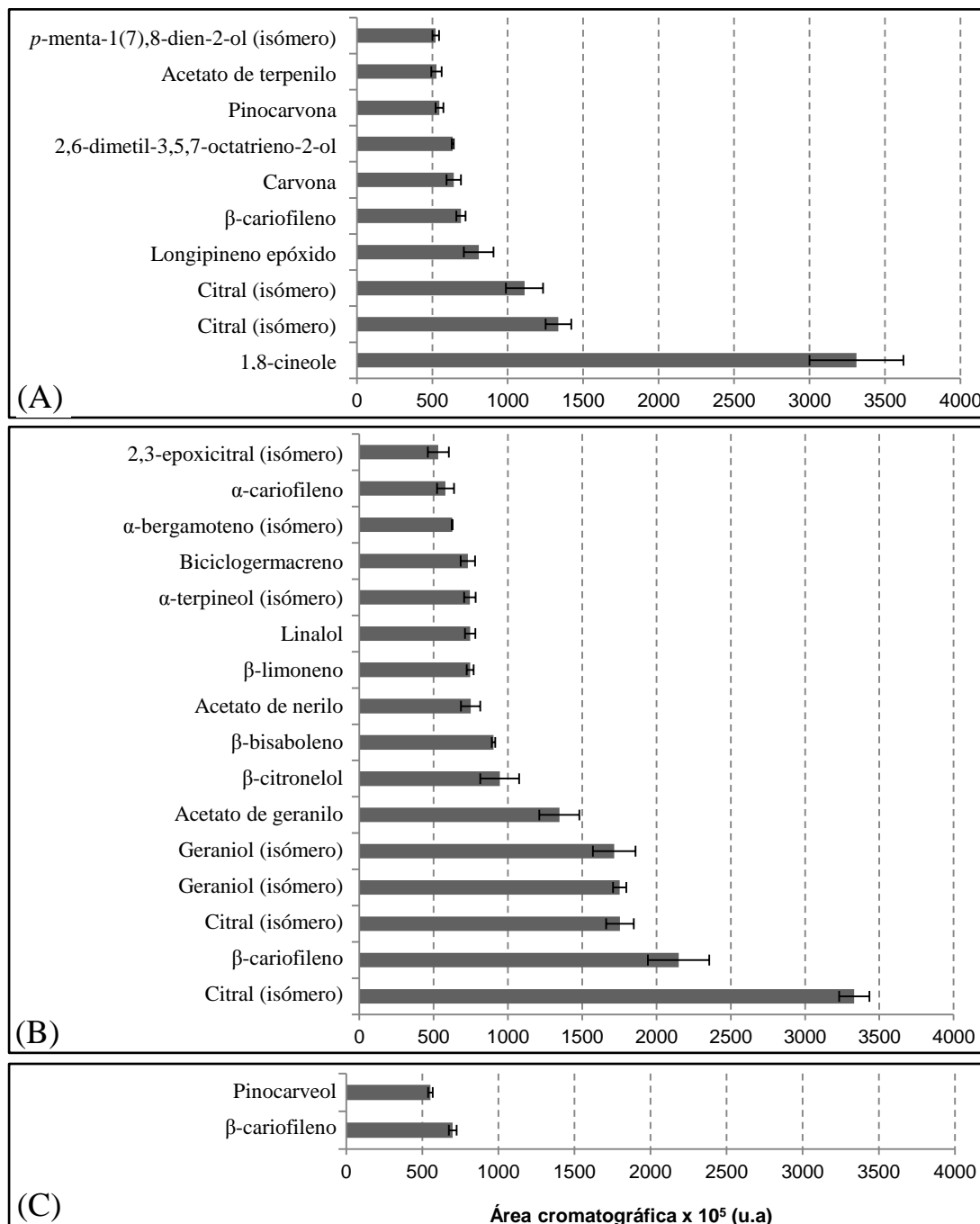


Figura 26 — Compostos terpênicos em C₁₀ e C₁₅ presentes nas folhas secas de *Eucalyptus globulus* L. (A) e *Citrus limon* L. (B) e na amostra comercial de *Hypericum androsaemum* L. (C), cuja área cromatográfica é maior que 500 x 10⁵ unidades arbitrárias (u.a)

4. Resultados e discussão

Num trabalho efectuado anteriormente [27] os compostos maioritários foram: limoneno, β -cariofileno, β -pineno, β -bisaboleno e o isómero do β -ocimeno. Destes apenas um é sesquiterpeno do tipo hidrocarboneto (o β -cariofileno), os outros são monoterpenos do tipo hidrocarboneto. Estas diferenças podem-se explicar pelo facto de as folhas usadas nesse trabalho [27] e as usadas no presente trabalho terem sido cultivadas em zonas geográficas diferentes e colhidas em anos e épocas do ano diferentes. Relativamente às folhas secas da planta de *H. androsaemum* L., num trabalho anterior [27] os compostos identificados pertenciam principalmente à família dos sesquiterpenos. No presente trabalho os compostos identificados foram maioritariamente compostos terpénicos em C_{15} do tipo hidrocarboneto. Verifica-se, pela observação da figura 26 (C), que em relação às plantas secas de *E. globulus* L. e de *C. limon* L. os compostos identificados na planta seca de *H. androsaemum* L. estão em quantidades mais reduzidas, o que era expectável tendo em conta as massas usadas de cada planta seca (*E. globulus* L. = 5,39 g, *C. limon* L. = 1,16 g e *H. androsaemum* L. = 0,54 g). Dos compostos identificados apenas o β -cariofileno e o pinocarveol apresentam áreas cromatográficas superiores a 500×10^5 u.a. ($699,69 \times 10^5$ e $553,02 \times 10^5$, respectivamente), sendo estes os compostos maioritários nas folhas secas do *H. androsaemum* L.. Na figura 27 é apresentado o gráfico de barras desta planta seca para os compostos cuja área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a), é maior que 100×10^5 u.a.

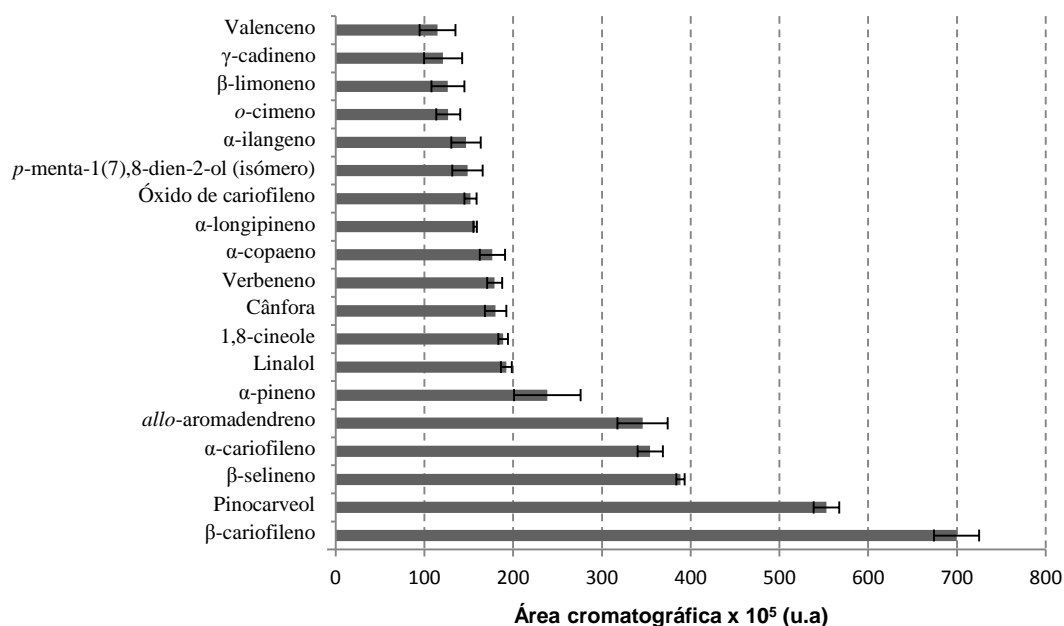


Figura 27 — Compostos terpénicos em C_{10} e C_{15} presentes nas folhas da planta seca de *H. androsaemum* L. cuja área cromatográfica é maior que 100×10^5 unidades arbitrárias (u.a).

4. Resultados e discussão

Observando a figura anterior verifica-se que o β -selineno ($388,43 \times 10^5$), o α -cariofileno ($354,33 \times 10^5$), o *allo*-aromadendreno ($345,78 \times 10^5$) e o α -pineno ($238,44 \times 10^5$) também se encontram em grande quantidade. Destes compostos apenas o pinocarveol é monoterpénico, os outros pertencem ao grupo dos sesquiterpenos do tipo hidrocarboneto. No trabalho realizado previamente [27] verificou-se que os compostos maioritários presentes nas folhas secas da planta de *H. androsaemum* L. pertenciam ao grupo dos sesquiterpenos do tipo hidrocarboneto: β -cariofileno, γ -elemeno, α -humuleno, β -elemeno e δ -cadineno. Estas diferenças podem-se explicar pelo facto de as folhas usadas no presente trabalho serem de uma amostra comercial enquanto as usadas no trabalho prévio [27] foram cultivadas em Aveiro.

A tabela 13 diz respeito aos compostos terpénicos (C_{10} e C_{15}) que foram identificados para cada uma das plantas secas em estudo no trabalho presente em comparação com os resultados descritos na literatura. Relativamente a plantas secas apenas um único estudo foi encontrado [27]. Tendo em conta que nesse trabalho e no presente trabalho não foi possível determinar o nome de alguns compostos estes não são tidos em conta na elaboração da tabela 13 que se segue.

4. Resultados e discussão

Tabela 13 — Compostos terpênicos (C₁₀ e C₁₅) presentes nas plantas secas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L.: (a) — identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS no presente trabalho; Lit. — reportados na literatura em trabalhos anteriores. ([] — indicação das referências bibliográficas; () — nº de isômeros identificados).

Nome do Composto	PLANTA SECA					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₀ HIDROCARBONETOS						
3,6-dimetileno-1,7-Octadieno	x	—	—	—	—	—
Canfeno	x	—	x	—	x	—
Cosmeno (isômeros)	x (3)	—	x (3)	—	x (1)	—
Dureno	—	—	—	—	x	—
<i>allo</i> -Ocimeno (isômeros)	x (2)	[27] (1)	x	[27]	x (2)	—
<i>o</i> -Cimeno	x	—	x	—	x	—
<i>p</i> -Cimeno	x	[27]	—	[27]	—	[27]
Pseudolimoneno	x	—	—	—	—	—
Sabineno	x	—	x	[27]	—	—
Verbeneno	x	—	—	—	x	—
α -Felandreno	—	—	x	—	—	—
α -Pineno	x	[27]	x	[27]	x	—
α -Terpineno	x	—	x	[27]	—	—
α -Terpinoleno	x	—	x	[27]	—	—
α -Tujeno	—	—	x	[27]	x	—
β -Felandreno	x	—	x	—	x	—
β -Limoneno	x	[27]	x	[27]	x	[27]
β -Mirceno	x	[27]	x	[27]	x	—
β -Ocimeno (isômeros)	x (2)	—	x (2)	[27] (2)	x (2)	—
β -Pineno	x	[27]	x	[27]	x	—
γ -Terpineno	x	[27]	x	[27]	—	—
δ -3-Careno	x	—	x	[27]	x	—
Sub-total (nº de compostos)	23	7	20	14	16	2
Novos compostos	16		5		13	
C₁₀ OXIGENADOS						
Álcoois						
1,8-mentadien-4-ol	x	—	x	—	x	—
2,6-dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol	x	—	x	—	x	—
2-careno-4-ol	x	—	—	—	—	—
2-pinanol	x	—	—	—	—	—
3(10)-careno-2-ol	x	—	—	—	—	—
3(10)-careno-4-ol	x	—	—	—	—	—
4-terpineol	x	—	x	—	x	—
4-tujanol	x	—	x	—	—	—
7-metil-3-metileno-6-octen-1-ol	—	—	x	—	—	—
Carveol (isômeros)	x (2)	[27] (1)	x (2)	[27] (2)	x (2)	—
Dihidro-carveol (isômeros)	x (2)	—	—	—	—	—
Dihidro-mircenol	—	—	x	—	x	—
Borneol	x	[27]	x	—	x	—
Geraniol	x	[27]	x	[27]	x	—
Hidrato de canfeno	x	—	x	—	x	—
Ipsdienol	x	—	—	—	—	—
Isopulegol	x	—	x	[27]	x	—
Linalol	x	—	x	[27]	x	—
Mentol	—	—	x	—	x	—
Mirtanol	x	—	—	—	—	—
Mirtenol	x	—	x	[27]	x	—
<i>p</i> -cimeno-8-ol	x	—	—	—	—	—
Pinocarveol	x	[27]	x	—	x	—
<i>p</i> -ment-2-en-1-ol	—	—	x	—	—	—
<i>p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol (isômeros)	x (2)	[27] (2)	x (1)	[27] (1)	x (1)	—
<i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol (isômeros)	x (2)	[27] (1)	x (1)	[27] (1)	x (1)	—
Verbenol (isômeros)	x (2)	—	x (2)	—	x (2)	—
α -felandren-8-ol	x	—	x	—	x	—
α -terpineol (isômeros)	x (2)	—	x (2)	—	x (2)	[27] (1)
β -citronelol	x	[27]	x	[27]	x	—
β -fenchol	x	—	x	—	x	—
β -terpineol	x	—	—	—	—	—

4. Resultados e discussão

Nome do Composto	PLANTA SECA					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₀ OXIGENADOS (cont.)						
Álcoois (cont.)						
Sub-total (n° de compostos)	34	8	26	9	23	1
Novos compostos	26		17		22	
C₁₀ OXIGENADOS (cont.)						
Aldeídos						
2-etilideno-6-metil-3,5-heptadienal	x	—	—	—	—	—
3-Caren-10-al	x	—	x	—	—	—
Cuminal	x	—	—	—	—	—
Citral (isômeros)	x (2)	[27] (1)	x (2)	[27] (2)	x (2)	—
Mirtenal	x	—	x	[27]	x	—
Perila aldeído	x	—	x	—	—	—
Safranal	—	—	—	—	x	—
α -Canfolenal	x	—	x	—	x	—
β -Citronelal	x	—	x	[27]	x	—
Sub-total (n° de compostos)	9	1	7	4	6	0
Novos compostos	8		3		6	
Cetonas						
2-metil-6-metileno-1,7-Octadien-3-ona	x	—	x	—	x	—
Cânfora	x	—	—	—	x	—
Carvenona	x	—	—	—	—	—
Carvona	x	[27]	x	[27]	x	—
Carvotanacetona	x	—	—	—	x	—
Dihidrocarvona (isômeros)	x (2)	—	x (2)	—	x (2)	—
Fenchona	—	—	x	—	x	—
Isomentona	—	—	—	—	x	—
Pinocanfona (isômeros)	x (2)	—	x (2)	—	x (2)	—
Pinocarvona	x	[27]	x	—	x	—
Piperitona	x	[27]	x	—	x	—
Verbenona	x	[27]	x	[27]	x	—
β -tujona	x	—	—	—	x	—
Sub-total (n° de compostos)	13	4	10	2	14	0
Novos compostos	9		8		14	
Óxidos/ epóxidos						
2,3-epoxicarano	x	—	x	—	x	—
2,3-epoxicitral (isômeros)	x (2)	—	x (1)	—	x (1)	—
3,9-epoxi-p-menta-1,8(10)-dieno	x	—	—	—	—	—
Epoxi-ocimeno	x	—	x	—	—	—
Epoxi-terpinoleno	—	—	x	—	—	—
Herbóxico	x	—	—	—	x	—
Óxido de limoneno (isômeros)	x (2)	—	x (2)	[27] (1)	x (2)	—
Óxido de linalol (isômeros)	x (2)	—	x (2)	—	x (2)	—
Óxido de Nerol	x	—	—	—	x	—
Óxido de rosa	x	—	—	—	x	—
Óxido de α -pineno	x	—	—	—	x	—
Sub-total (n° de compostos)	13	0	8	1	10	0
Novos compostos	13		7		10	
Éteres						
1,8-cineole	x	[27]	x	—	x	—
4-hidroxi-1,8-cineole	x	—	—	—	—	—
exo-2-hidroxi-1,8-cineole	x	—	—	—	—	—
Sub-total (n° de compostos)	3	1	1	0	1	0
Novos compostos	2		1		1	
Outros						
Rosefurano	—	—	x	—	—	—
Ácido gerânico	x	—	x	—	—	—
Sub-total (n° de compostos)	1	0	2	0	0	0
Novos compostos	1		2		0	

4. Resultados e discussão

Nome do Composto	PLANTA SECA					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₀ OXIGENADOS (cont.)						
Ésteres						
Acetato de 4(10)-tujen-3-ol	x	—	x	—	x	—
Acetato de borneol (isômeros)	x (2)	—	x (1)	—	x (1)	—
Acetato de carvilo (isômeros)	x (2)	—	—	—	—	—
Acetato de citrônello	x	—	x	—	—	—
Acetato de dihidrocarveol	x	—	x	—	—	—
Acetato de exo-2-hidroxi-cineole	x	—	x	—	x	—
Acetato de gerânio	x	—	x	—	—	—
Acetato de lavandulilo	—	—	x	—	—	—
Acetato de linalol	x	—	x	—	—	—
Acetato de mirtenilo	x	—	—	—	—	—
Acetato de nerilo	x	—	x	—	—	—
Acetato de pinocarvilo	x	—	—	—	—	—
Acetato de terpenilo	x	—	x	—	x	—
Acetato de α -fenchilo	x	—	—	—	—	—
Formato de citrônello	—	—	x	—	—	—
Formato de gerânio	—	—	x	—	—	—
Formato de linalilo	—	—	—	—	x	—
Formato de nerilo	—	—	x	—	—	—
Propionato de citrônello	—	—	x	—	—	—
Propionato de gerânio	x	—	x	—	—	—
Propionato de nerilo	x	—	x	—	—	—
Sub-total (n° de compostos)	17	0	16	0	5	0
Novos compostos	17		16		5	

N° de compostos C₁₀ oxigenados	90	14	70	16	59	1
Novos compostos C₁₀ oxigenados	76		54		58	

N° de compostos C₁₀	113	21	90	30	75	3
Novos compostos C₁₀	92		60		72	

C₁₅ HIDROCARBONETOS						
2,4-diisopropenil-1-metil-1-vinil-ciclohexano	x	—	—	—	—	—
4,5,9,10-dehidro-isolongifoleno	—	—	—	—	x	—
8,9-dehidro- <i>neo</i> -isolongifoleno	x	—	x	—	—	—
9,10-dehidro-isolongifoleno	x	—	—	—	—	—
<i>allo</i> -aromadendreno (isômeros)	x	[27] (2)	x	—	x (1)	[27] (2)
Aristoleno	x	—	—	—	—	—
Aromadendreno	x	[27]	x	[27]	—	[27]
Bicicloelemeno	x	—	x	[27]	x	—
Biciclogermacreno	x	—	x	[27]	—	—
Calameneno	x	[27]	x	—	x	[27]
Ciclo-sativeno	x	—	—	—	x	—
Dehidroaromadendreno	x	[27]	—	—	—	—
Dihidrocurcumeneno	—	—	—	—	x	—
Germacreno A	—	—	x	—	—	—
Germacreno B	—	—	—	—	x	[27]
Germacreno D	—	—	x	—	x	—
Isoledeno	x	[27]	x	—	x	—
Ledano	x	—	x	—	—	—
Ledeno	x	[27]	x	—	—	—
Sativeno	—	—	x	—	—	—
Tujopseno	x	—	—	—	—	—
Valenceno	—	[27]	—	—	x	—
Zingibereno	—	—	x	—	—	—
α -amorfeneno	x	[27]	x	—	x	[27]
α -bergamoteno	x	—	x	[27]	x	—
α -bisaboleno	x	—	x	—	—	—
α -cadineno	—	—	x	—	x	—
α -calacoreno	—	—	—	—	x	[27]
α -cariofileno	x	[27]	x	[27]	x	[27]
α -cedrano	—	—	—	—	—	—
α -cedreno	x	—	—	—	x	—

4. Resultados e discussão

Nome do Composto	PLANTA SECA					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₅ HIDROCARBONETOS (cont.)						
α -cloveno	x	—	—	—	x	—
α -copaeno	x	[27]	x	[27]	x	[27]
α -cubebeno	x	—	x	—	x	—
α -cubeneno	x	—	x	—	—	—
α -curcumeno	—	—	x	[27]	x	—
α -farneseno	x	—	x	—	—	—
α -guaieno	x	—	—	—	—	—
α -gurjuneno	x	[27]	x	—	—	—
α -himachaleno	—	—	—	—	x	[27]
α -ilangeno	x	—	—	—	x	[27]
α -longifoleno	x	—	—	—	x	—
α -longipineno	x	—	—	—	x	—
α -muuroleno	x	—	x	—	x	—
α -santaleno	x	—	x	—	x	—
α -selineno	—	[27]	—	—	x	—
β -bisaboleno	x	—	x	[27]	—	—
β -bourboneno	x	—	x	—	x	[27]
β -cadineno	—	—	x	—	x	—
β -cariofileno	x	[27]	x	[27]	x	[27]
β -elemeno (isómeros)	x (1)	—	x (2)	[27] (1)	x (1)	[27] (1)
β -farneseno (isómeros)	x (2)	—	x (2)	[27] (1)	x (2)	—
β -gurjuneno	x	[27]	x	—	x	—
β -himachaleno	—	—	x	—	—	—
β -panasinseno	—	—	x	—	—	—
β -santaleno (isómeros)	x (1)	—	x (1)	[27]	x (1)	—
β -selineno	x	[27]	x	—	x	[27]
β -sesquifelandreno	—	[27]	x	—	—	—
β -vatireno	x	—	—	—	—	—
γ -bisaboleno	—	—	x	—	—	—
γ -cadineno	x	—	x	—	x	—
γ -cariofileno	x	—	x	—	x	—
γ -elemeno	—	—	—	—	x	[27]
γ -gurjuneno	x	[27]	x	—	x	—
γ -selineno	—	—	—	—	x	[27]
δ -cadineno	x	—	x	—	x	[27]
δ -panasinsino	—	—	x	—	—	—
Sub-total (n° de compostos)	46	18	46	12	42	18
Novos compostos	25		34		22	
C₁₅ OXIGENADOS						
Álcoois						
Epiglobulol	x	[27]	x	—	x	—
Espatulol	x	[27]	x	[27]	x	[27]
Germacreno D-4-ol	—	—	x	—	—	—
Globulol	x	—	x	—	x	—
Guaiol	x	—	—	—	x	—
Ledol	x	[27]	—	—	x	—
Nerolidol	—	—	x	—	—	—
Palustrol	x	[27]	—	—	—	—
Rosifoliol	x	—	—	—	x	—
Viridiflorol	x	[27]	x	—	x	—
β -Eudesmol	x	—	—	—	x	—
Sub-total (n° de compostos)	9	5	6	1	8	1
Novos compostos	4		5		7	
Óxidos e epóxidos						
Calareno epóxido	x	—	—	—	—	—
α -cedreno epóxido	—	—	—	—	x	—
Longipineno epóxido	x	—	x	—	x	—
Óxido de <i>allo</i> -aromadendreno	x	—	—	—	—	—
Óxido de cariofileno	x	—	x	[27]	x	[27]
α -bisaboleno epóxido	x	—	—	—	—	—
N° de compostos	5	0	2	1	3	1
Novos compostos	5		1		2	

4. Resultados e discussão

Nome do Composto	PLANTA SECA					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₅ OXIGENADOS (cont.)						
Cetonas						
Canferenona	—	—	—	—	x	—
Humuladienona	x	—	—	—	x	—
Nº de compostos	1	0	0	0	2	0
Novos compostos	1		0		2	
Nº de compostos C₁₅ oxigenados	15	5	8	2	13	2
Novos compostos C₁₅ oxigenados	10		6		11	
Nº de compostos C₁₅	61	23	54	14	55	20
Novos compostos C₁₅	38		40		35	
Nº de compostos C₁₀ e C₁₅	174	44	144	44	130	23
Novos compostos C₁₀ e C₁₅	130		100		107	

x → identificado no presente trabalho; () → indicação do nº de isómeros identificados; — → não identificado no presente trabalho/em trabalhos anteriores; [] → indicação da referência bibliográfica na qual foi referido o composto.

Analisando a tabela 13 verifica-se que:

- ✓ há um pequeno número de compostos que foi referido na literatura e que não foi identificado no presente trabalho;
- ✓ há bastantes compostos que foram referidos na literatura e que se identificaram no presente trabalho;
- ✓ há bastantes compostos que se identificaram no presente trabalho e que não foram referidos na literatura anteriormente.

O isómero do *allo*-aromadendreno, o valenceno e o α -selineno foram referidos na literatura [27] para a planta seca de *E. globulus* L. mas não foram identificados no actual trabalho. Nesta planta seca os compostos: *allo*-ocimeno, *p*-cimeno, α -pineno, limoneno, β -mirceno, β -pineno, γ -terpineno, carveol, borneol, geraniol, pinocarveol, *p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *p*-menta-2,8-dien-1-ol, β -citronelol, citral, carvona, pinocarvona, piperitona, verbenona, 1,8-cineole, isómeo do *allo*-aromadendreno, aromadendreno, calameneno, dehidroaromadendreno, isoleveno, ledeno, β -cariofileno, α -amorfenno, α -cariofileno, α -copaeno, α -gurjuneno, β -gurjuneno, β -selineno, γ -gurjuneno, epiglobulol, espatulenol, ledol, palustrol e viridiflorol já tinham sido relatados na literatura [27] e foram identificados na amostra em estudo neste trabalho. Através do presente trabalho foi possível identificar 130 compostos novos, dos quais 16 compostos terpénicos em C₁₀ do tipo hidrocarboneto, 76 compostos em C₁₀ oxigenados, 18 compostos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto e 10 compostos em C₁₅ oxigenados. Verifica-se que nos compostos C₁₀ foi possível identificar mais compostos contendo oxigénio (principalmente pertencentes à

4. Resultados e discussão

família dos álcoois) enquanto nos compostos em C₁₅ se identificaram mais compostos do tipo hidrocarboneto. Relativamente à planta seca de *C. limon* L. analisada neste trabalho não foi possível identificar o *p*-cimeno anteriormente identificado na literatura [27]. Todos os outros compostos relatados na literatura (*allo*-ocimeno, sabineno, α -pineno, α -terpineno, α -terpinoleno, α -tujeno, β -limoneno, β -mirceno, β -pineno, γ -terpineno, δ -3-careno, 4-terpineol, carveol, geraniol, isopulegol, linalol, mirtenol, *p*-menta-1(7),8-dien-2-ol, *p*-menta-2,8-dien-1-ol, β -citronelol, citral (dois isómeros), mirtenal, β -citronelal, carvona, verbenona, óxido de limoneno, aromadendreno, bicicloelemeno, biciclogermacreno, β -farneseno (dois isómeros), β -cariofileno, α -cariofileno, α -bergamoteno, α -copaeno, α -curcumeno, β -bisaboleno, β -elemeno, β -santaleno, espatulenol e óxido de cariofileno) [27] foram identificados. Com o presente trabalho foram ainda identificados 100 compostos novos sendo que 6 foram monoterpenos não contendo oxigénio e 54 contendo oxigénio, 34 sesquiterpenos não oxigenados e 6 compostos oxigenados. Verifica-se que no caso dos compostos terpénicos em C₁₀ os compostos novos identificados possuem oxigénio na sua composição e pertencem sobretudo à família dos álcoois. Já no que diz respeito aos compostos terpénicos em C₁₅ acontece o oposto, os compostos novos identificados não possuem oxigénio. Quanto ao *H. androsaemum* L. o *p*-cimeno, o isómero do *allo*-aromadendreno e o aromadendreno foram os únicos compostos identificados previamente na literatura que não se identificaram no presente trabalho. Todos os outros (carveol, α -terpineol, citral (dois isómeros), germacreno B, β -cariofileno, α -cariofileno, γ -elemeno, γ -selineno, espatulenol e óxido de cariofileno) [27] foram identificados. Foi ainda possível identificar 107 compostos novos e destes a maior parte pertence ao grupo dos compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados.

De um modo geral, tendo em conta as plantas secas das três espécies em estudo no presente trabalho — no qual se recorreu à micro-extracção em fase sólida, combinada com a cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa por tempo de voo (HS-SPME/GC \times GC-ToFMS) — foi possível identificar mais compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados da família dos álcoois do que quando se usou HS-SPME/GC-qMS [27] e por isso pode-se afirmar que o uso desta técnica permitiu atingir o objectivo de determinar o perfil metabólico das plantas secas, com base na composição em compostos mono e sesquiterpénicos tendo-se identificado novos compostos.

4. Resultados e discussão

4.2. Estudo da composição terpénica em C₁₀ e C₁₅ dos óleos essenciais

Os rendimentos das extracções dos óleos essenciais, realizadas através de destilação por arrastamento de vapor, foram de 0,09 % (m/m) para o *Hypericum androsaemum* L., 0,15 % (m/m) para o *Citrus limon* L. e 1,48 % (m/m) para o *Eucalyptus globulus* L..

No ano de 1997 Silvestre *et al.* [13] usaram folhas frescas de *Eucalyptus globulus* L., colhidas em três épocas do ano diferentes e de árvores de duas localizações diferentes, também foram usadas folhas com diferentes idades e através de hidrodestilação obtiveram os respectivos óleos essenciais tendo obtido rendimentos entre 1,4 e 2,7 % (m/m). Em 1999 Della Porta *et al.* [14] obtiveram o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. por hidrodestilação tendo obtido um rendimento de 2,0 % (m/m). Em 2002 Cimanga *et al.* [15] procederam à hidrodestilação de folhas frescas de *Eucalyptus globulus* L. tendo obtido um rendimento de 1,87 % (m/m). Analisando os resultados referidos na literatura verifica-se que os obtidos neste trabalho são coerentes.

Em 2002 Vekiari *et al.* [16] procederam à hidrodestilação de folhas de *Citrus limon* L. colhidas, em diferentes intervalos de tempo durante um período superior a um ano, do topo de 10 árvores com 16 anos de idade. Os autores tiveram o cuidado de colher folhas com 5-6 meses de idade. Os rendimentos foram expressos em mililitros de óleo essencial por quilograma de peso de folhas frescas e variaram entre os 3,5 e os 5,3 mL/kg. No presente trabalho também se procedeu à hidrodestilação de folhas frescas de *Citrus limon* L. mas o rendimento foi expresso em percentagem (m/m). Foram utilizadas 463,0 g de folhas frescas tendo-se obtido cerca de 2 mL de óleo essencial o que corresponde a um rendimento aproximado de 4,32 mL/kg, o que vai ao encontro do que é dito na literatura.

Guedes *et al.* (2003) [20] efectuaram hidrodestilação das folhas frescas de *Hypericum androsaemum* L. colhidas em Julho e Novembro de 1999 e Junho de 2000 e obtiveram rendimentos entre 0,9 e 4,1 mg/g. No ano seguinte Guedes *et al.* [21] efectuaram hidrodestilação das folhas frescas de *Hypericum androsaemum* L. colhidas em Julho, Setembro e Novembro de 1999, e em Fevereiro, Abril e Junho de 2000 e obtiveram rendimentos entre 0,97 e 1,3 % (m/m). No ano de 2005 Morteza-Semnani *et al.* [22] procederam à hidrodestilação de folhas secas de *Hypericum androsaemum* L. com um rendimento de 0,97 % (m/m). Comparando os dados da literatura com o rendimento obtido neste trabalho verifica-se que o resultado é coerente.

4. Resultados e discussão

Na figura 28 encontram-se representados os diagramas de contornos relativos aos óleos essenciais das folhas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L. obtidos por destilação por arrastamento de vapor. Os diagramas de contornos estão organizados à semelhança dos diagramas de contornos referentes às plantas secas de cada espécie (secção 4.1.). Analisando a figura 28 verifica-se que o óleo essencial de *E. globulus* L. apresenta um maior número de compostos e que o óleo de *H. androsaemum* L. apresenta um número de compostos em menor número. Verifica-se que no óleo de *E. globulus* L. encontram-se mais grupos que nos outros óleos sendo possível observar C_{10} do tipo hidrocarboneto, C_{10} oxigenados (dos quais fazem parte os álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres), C_{15} do tipo hidrocarboneto e C_{15} oxigenados sendo que o maior número de compostos pertence aos C_{10} oxigenados. Já no óleo essencial de *C. limon* L. não se observam os compostos C_{15} oxigenados e mais uma vez os compostos C_{10} oxigenados encontram-se num número elevado. No que respeita ao óleo de *H. androsaemum* L. não se observam compostos C_{10} oxigenados havendo um grande destaque dos compostos sesquiterpénicos, o que era expectável tendo em conta os resultados reportados na literatura para o óleo desta espécie.

No que diz respeito à área cromatográfica observa-se que no caso do *C. limon* L. esta é maior (sobretudo quando se observa o grupo dos aldeídos). Para o *H. androsaemum* L. verifica-se que a área cromatográfica é menor. Observando o diagrama de contornos relativo ao óleo de *E. globulus* L. verifica-se que os compostos terpénicos em C_{10} são em maior número do que os compostos terpénicos em C_{15} e que a área cromatográfica tem um comportamento semelhante. Relativamente aos compostos terpénicos em C_{15} os compostos do tipo hidrocarboneto encontram-se em maior número mas numa menor área cromatográfica comparativamente aos compostos terpénicos em C_{15} oxigenados. Relativamente ao diagrama de contornos do *C. limon* L. verifica-se que o grupo dos compostos monoterpénicos, principalmente os que contêm oxigénio, é bem mais representativo quando comparado ao grupo dos compostos sesquiterpénicos, no qual só se observam compostos do tipo hidrocarboneto.

4. Resultados e discussão

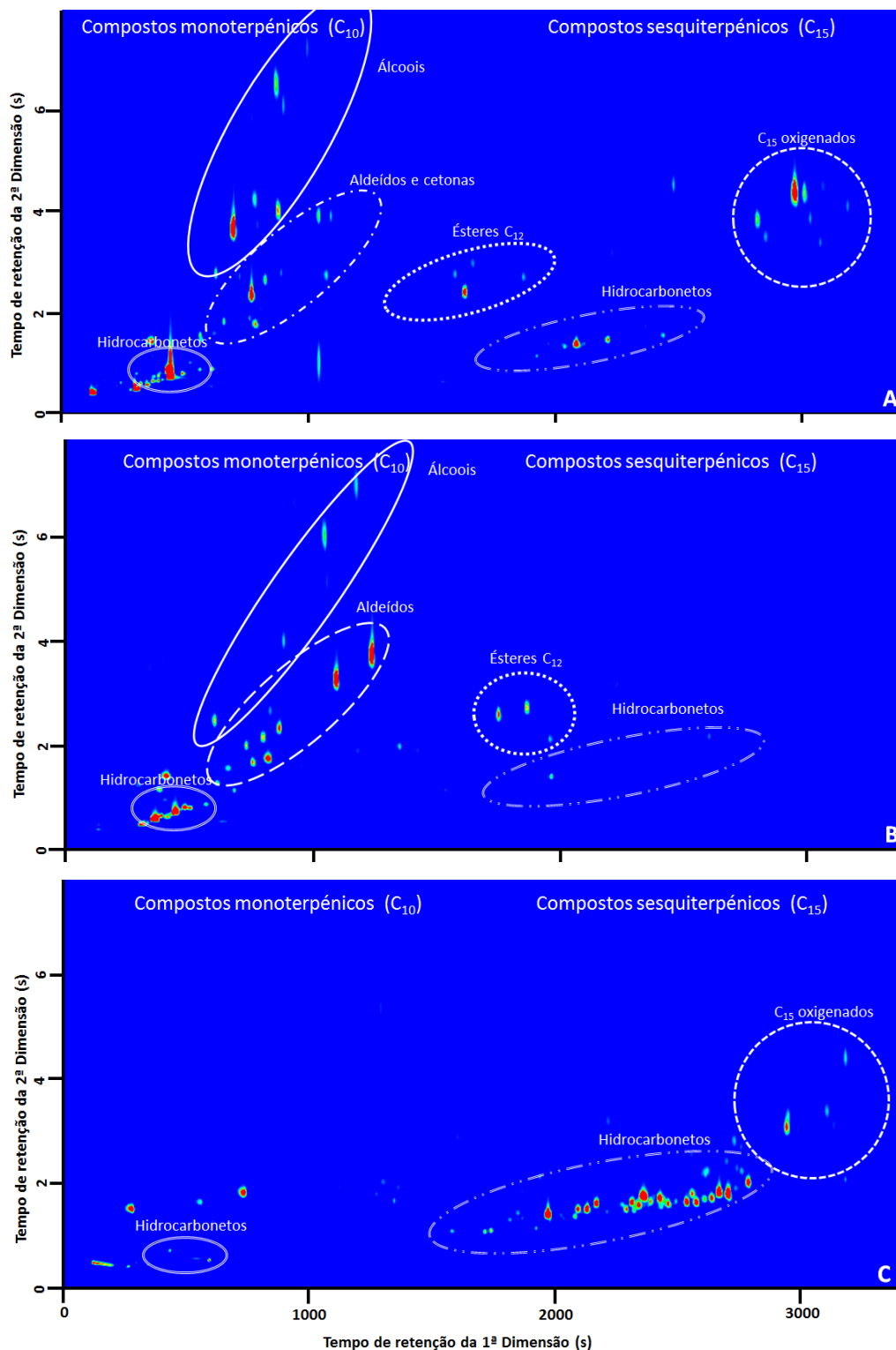


Figura 28 — Diagramas de contornos do GC × GC-ToFMS em corrente total de iões referentes aos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L. (A), *Citrus limon* L. (B) e *Hypericum androsaemum* L. (C), obtidos por destilação por arrastamento de vapor mostrando a distribuição de classes de compostos.

4. Resultados e discussão

Quando se analisa o diagrama de contornos respeitante ao óleo essencial de *H. androsaemum* L. aquilo que foi descrito na literatura ([20 e 22]) é comprovado pois é muito evidente que o grupo dos compostos terpénicos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto se destaca bastante dos outros grupos.

A figura 29 mostra o número de compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ identificados para cada óleo essencial de cada uma das espécies de plantas em estudo no presente trabalho, bem como a área cromatográfica ocupada por cada um dos grupos de compostos (expressa em unidades arbitrárias e também em termos percentuais). Pela sua análise pode verificar-se que o óleo essencial que apresenta um maior número de compostos terpénicos, em C₁₀ e C₁₅, bem como uma maior área cromatográfica (em u.a) é o *E. globulus* L.. Neste óleo foram identificados 85 compostos, aos quais corresponde uma área cromatográfica de $4,25 \times 10^8$ u.a.. Relativamente aos óleos de *C. limon* L. e *H. androsaemum* L. foram identificados 35 compostos e 50 compostos, respectivamente. Verifica-se que foram identificados menos compostos no óleo de *C. limon* L. mas em termos de área cromatográfica os óleos apresentam valores similares. Dos compostos identificados no óleo de *E. globulus* L. os compostos em maior número são os compostos terpénicos em C₁₀ oxigenados, sendo que estes compostos também apresentam a área cromatográfica mais elevada. No óleo essencial de *C. limon* L. os compostos que se encontram em maior número pertencem ao grupo dos compostos terpénicos em C₁₀ que contêm oxigénio. Quanto ao óleo de *H. androsaemum* L. foram identificados 50 compostos sendo que em maior número estão os compostos terpénicos em C₁₅. Considerando todos os compostos aqueles que se encontram em maior número são os compostos terpénicos em C₁₀ nos óleos de *E. globulus* L. e *C. limon* L. enquanto no óleo de *H. androsaemum* L. os compostos terpénicos em C₁₅ estão num número superior. Dentre os compostos terpénicos em C₁₀ verifica-se que os oxigenados são em maior número, ao contrário do que acontece com o compostos terpénicos em C₁₅, nestes os compostos não oxigenados são em maior número.

4. Resultados e discussão

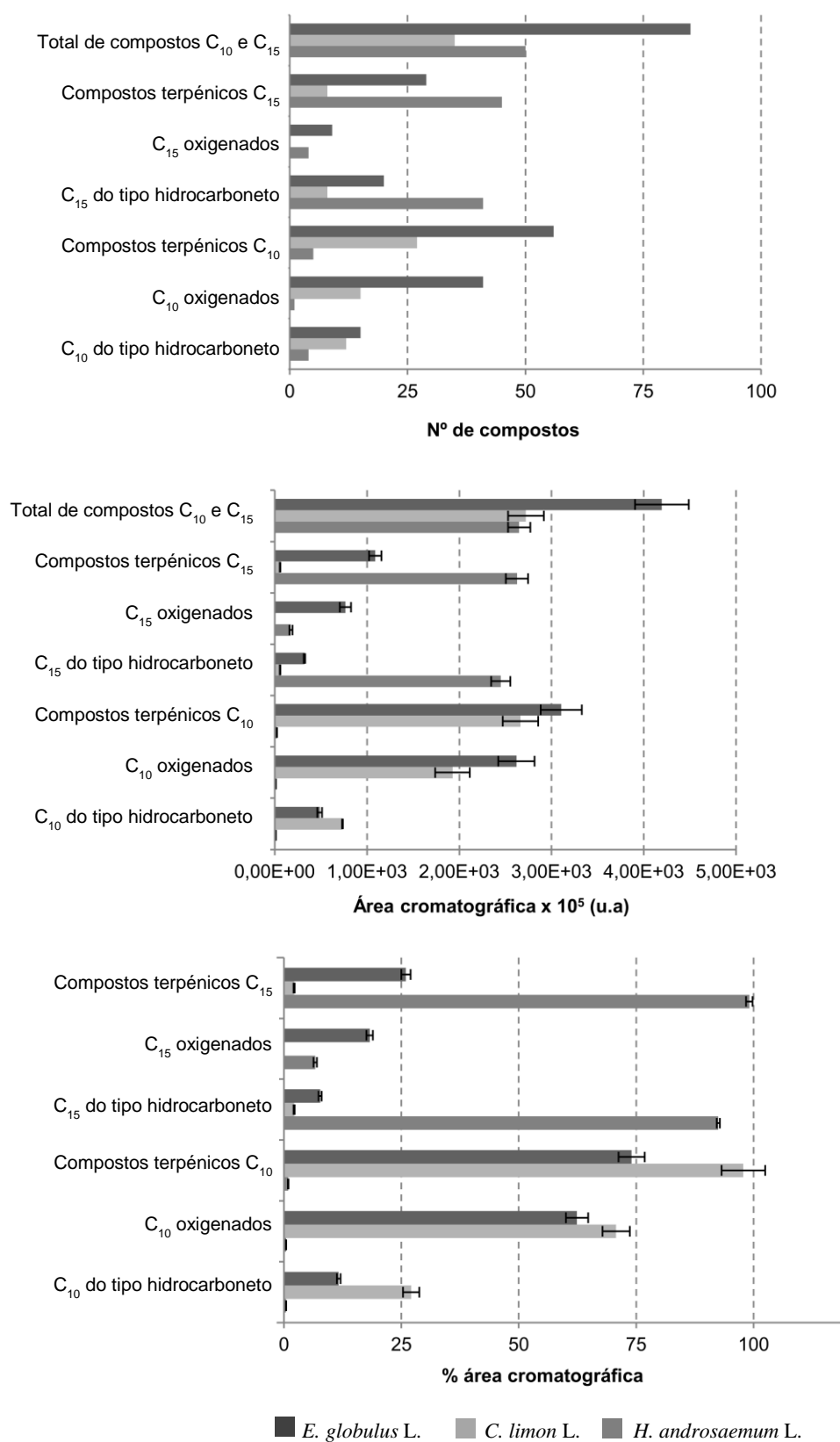


Figura 29 — Gráficos de barras referentes ao número de compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ e à área cromatográfica, expressa em unidades arbitrárias (u.a.) e também em percentagem, para cada um dos óleos obtidos a partir de cada espécie de planta em estudo.

4. Resultados e discussão

Analisando o gráfico de barras referente à área cromatográfica (em u.a.) relativamente aos compostos monoterpénicos do tipo hidrocarboneto verifica-se que esta se encontra organizada pela seguinte ordem: *C. limon* L. = $7,56 \times 10^7$ > *E. globulus* L. = $4,81 \times 10^7$ > *H. androsaemum* L. = $1,18 \times 10^6$. Quanto aos compostos monoterpénicos contendo oxigénio a área cromatográfica segue a seguinte ordem: *E. globulus* L. = $2,68 \times 10^8$ > *C. limon* L. = $1,930 \times 10^8$ > *H. androsaemum* L. = $1,22 \times 10^6$. Relativamente aos compostos sesquiterpénicos do tipo hidrocarboneto temos: *H. androsaemum* L. = $2,45 \times 10^8$ > *E. globulus* L. = $3,23 \times 10^7$ > *C. limon* L. = $5,90 \times 10^6$. Por fim, no que respeita aos compostos sesquiterpénicos oxigenados o óleo que apresenta uma maior área cromatográfica (subtotal) é o *E. globulus* L. ($7,66 \times 10^7$). O óleo de *H. androsaemum* L. possui um valor de $1,72 \times 10^7$. No óleo de *C. limon* L. não foram identificados compostos sesquiterpénicos oxigenados.

Em termos de percentagem de área cromatográfica, e observando a figura 29, verifica-se que no caso do *E. globulus* L. os compostos terpénicos em C₁₀ ocupam uma percentagem superior aos compostos terpénicos em C₁₅ (74,37 % e 25,63 %, respectivamente). Verifica-se que para o caso do *C. limon* L. acontece o mesmo (97, 85 % da área cromatográfica obtida corresponde a compostos terpénicos em C₁₀ e apenas 2,15 % corresponde a compostos terpénicos em C₁₅). Nestes dois óleos os compostos terpénicos em C₁₀ contendo oxigénio ocupam uma maior percentagem de área cromatográfica do que os compostos C₁₀ do tipo hidrocarboneto. Assim, estes dois óleos são uma possível fonte deste tipo de compostos. Já em relação ao *H. androsaemum* L. acontece o oposto, 99,10 % da área cromatográfica obtida corresponde a compostos terpénicos em C₁₅ e só 0,90 % corresponde a compostos terpénicos em C₁₀ e desta vez os compostos sesquiterpénicos em maior percentagem de área cromatográfica (92,60 %) não contêm oxigénio (só 6,49 % da área cromatográfica é relativa a compostos contendo oxigénio). Por se apresentarem no óleo essencial de *H. androsaemum* L. numa percentagem tão elevada este óleo é uma boa fonte deste tipo de compostos.

Na tabela 14 encontram-se os compostos terpénicos (em C₁₀ e C₁₅) identificados nos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L., *Citrus limon* L. e *Hypericum androsaemum* L.. Esta tabela está organizada de forma semelhante à tabela 12 referente às plantas secas (secção 4.1.).

4. Resultados e discussão

Tabela 14 — Compostos voláteis identificados por GC × GC-ToFMS nos óleos essenciais, obtidos por destilação por arrastamento de vapor, a partir das folhas secas de *E. globulus* L., das folhas frescas de *C. limon* L. e da amostra comercial de *H. androsaemum* L. (média da área cromatográfica obtida x 10⁵, expressa em unidades arbitrárias – u.a.).

								ÓLEO ESSENCIAL					
								<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H.androsaemum</i> L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
¹ Dtr (s)	² Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do Composto						
COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS (C ₁₀)													
C ₁₀ HIDROCARBONETOS													
288	0,63	927	939	[107]	959	[38]	<i>α</i> -pineno	46,29	5	72,88	7	2,09	2
312	0,57	947	953	[107]	959	[109]	Canfeno	25,66	4	9,16	5	—	—
312	0,65	947	967	[107]	—	—	Verbeneno	27,55	3	—	—	—	—
344	0,62	974	978	[107]	982	[19]	<i>β</i> -pineno	55,37	3	55,93	8	1,94	10
368	0,71	994	991	[107]	995	[38]	<i>β</i> -mirceno	63,05	6	69,63	6	—	—
384	0,69	1004	1005	[107]	1016	[108]	<i>α</i> -felandreno	27,37	7	—	—	—	—
392	0,67	1008	1011	[107]	1019	[109]	<i>δ</i> -3-careno	—	—	39,73	7	—	—
416	0,73	1020	1018	[107]	1025	[108]	<i>α</i> -terpineno	9,44	1	17,19	5	—	—
416	1,00	1020	1020	[111]	—	—	<i>o</i> -cimeno	75,52	10	—	—	0,91	8
432	0,74	1027	1030	[112]	1038	[113]	<i>β</i> -limoneno	VT	—	265,56	7	6,83	5
432	1,44	1028	1026	[107]	1052	[58]	<i>p</i> -cimeno	81,80	5	—	—	—	—
464	0,86	1043	1040	[107]	1058	[38]	<i>β</i> -ocimeno (isômero)	5,42	3	40,36	4	—	—
472	0,89	1047	1050	[107]	1058	[38]	<i>β</i> -ocimeno (isômero)	1,87	4	107,27	9	—	—
488	0,83	1054	1062	[107]	1080	[38]	<i>γ</i> -terpineno	43,78	4	60,91	1	—	—
552	0,92	1085	1088	[107]	1113	[38]	<i>α</i> -terpinoleno	15,95	3	16,52	7	—	—
616	1,30	1110	1111	[107]	1125	[108]	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	1,62	4	—	—	—	—
696	1,26	1135	1147	[114]	1138	[38]	<i>allo</i> -ocimeno	—	—	0,65	10	—	—
Sub-total								15		12		4	
Área cromatográfica								4,81E+02	5	7,56E+02	1	1,18E+01	6
% Área cromatográfica								11,31	3	27,57	6	0,44	1
C ₁₀ OXIGENADOS													
Alcoois													
584	2,55	1101	1098	[107]	1109	[38]	Linalol	4,66	3	66,54	7	—	—
616	2,82	1111	1115	[107]	—	—	<i>β</i> -fenchol	48,49	8	—	—	—	—
640	3,43	1118	1140	[107]	—	—	Verbenol (isômero)	2,98	8	—	—	—	—
664	1,82	1125	1109	[107]	—	—	6-canfenol	5,59	6	—	—	—	—
672	3,67	1128	1139	[107]	1160	[108]	Pinocarveol	524,96	2	—	—	—	—
696	3,75	1135	1140	[107]	—	—	Sabinol	179,09	1	—	—	—	—
712	2,77	1140	1148	[107]	—	—	Hidrato de canfeno	10,04	8	—	—	—	—
768	4,35	1157	1165	[107]	1198	[47]	Borneol	71,08	3	—	—	—	—
768	5,89	1158	—	—	—	—	2,6-dimetil-1,5,7-octatrieno-3-ol	8,84	7	—	—	—	—
776	3,81	1160	1189	[107]	1224	[38]	<i>α</i> -terpineol (isômero)	14,39	3	—	—	—	—
808	2,70	1169	1177	[107]	1215	[38]	4-terpineol	49,56	8	16,31	6	—	—
808	4,01	1170	1189	[118]	—	—	1,8-mentadien-4-ol	5,70	7	—	—	—	—
840	2,42	1179	—	—	—	—	2-caren-4-ol	—	—	68,59	5	—	—
864	4,09	1187	1189	[121]	1224	[38]	<i>α</i> -terpineol (isômero)	163,09	7	34,29	11	—	—
880	6,18	1192	1194	[107]	1237	[38]	Mirtenol	46,16	3	—	—	—	—
896	5,20	1197	1217	[107]	1246	[108]	Carveol (isômero)	5,54	4	—	—	—	—
968	4,68	1213	1229	[107]	1261	[108]	Carveol (isômero)	38,28	7	—	—	—	—
1024	6,07	1225	1228	[107]	1245	[38]	Geraniol (isômero)	—	—	125,38	7	—	—
1032	5,21	1227	1228	[121]	1234	[38]	<i>β</i> -citronelol	—	—	34,25	8	—	—
1144	7,25	1252	1255	[107]	1265	[38]	Geraniol (isômero)	0,86	6	96,72	1	—	—
Sub-total								17		7		—	
Área cromatográfica								1,18E+03	11	4,42E+02	5	—	—
% Área cromatográfica								27,76	6	16,12	2	—	—
Aldeídos													
648	1,88	1120	1125	[107]	1133	[19]	<i>α</i> -canfolenal	26,14	8	—	—	—	—
736	1,72	1147	1153	[107]	—	—	<i>β</i> -citronelal	—	—	79,01	10	—	—
872	2,86	1189	1193	[107]	—	—	Mirtenal	14,46	7	—	—	—	—
1064	3,33	1234	1240	[107]	1265	[38]	Citral (isômero)	—	—	472,29	9	—	—
1200	3,78	1263	1270	[107]	1287	[38]	Citral (isômero)	—	—	669,57	14	—	—
Sub-total								2		3		—	
Área cromatográfica								4,06E+01	6	1,22E+03	11	—	—
% Área cromatográfica								0,96	2	44,53	5	—	—

4. Resultados e discussão

								ÓLEO ESSENCIAL					
¹Dtr (s)	²Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do Composto	E. globulus L.		C. limon L.		H.androsaemum L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS (C ₁₀) (cont.)													
C ₁₀ OXIGENADOS (cont.)													
Cetonas													
696	2,36	1135	—	—	—	—	2-metil-6-metileno-1,7-octadien-3-ona	1,80	3	—	—	—	—
752	1,98	1152	1160	[107]	—	—	Pinocanfona (isômero)	11,97	5	—	—	—	—
752	2,29	1152	1162	[107]	1181	[108]	Pinocarvona	352,58	7	—	—	—	—
792	2,10	1164	1173	[107]	—	—	Pinocanfona (isômero)	8,19	3	—	—	—	—
1072	3,68	1235	1242	[107]	1281	[47]	Carvona	31,78	2	—	—	—	—
1080	3,14	1237	1256	[127]	—	—	Carvotanacetona	2,18	8	—	—	—	—
Sub-total								6		—		0	
Área cromatográfica								4,09E+02	6	—		—	
% Área cromatográfica								9,62	0	—		—	
Óxidos e epóxidos													
368	0,80	994	988	[38]	1021	[38]	Herbóxico	11,61	5	—	—	—	—
384	0,79	1004	—	—	—	—	2,3-epoxicarano	20,25	7	—	—	—	—
424	0,85	1024	—	—	—	—	Epoxi-ocimeno (isômero)	25,36	3	—	—	—	—
512	1,63	1066	1074	[107]	1080	[108]	Óxido de linalol (isômero)	1,11	3	—	—	—	—
560	1,51	1089	1095	[128]	—	—	Óxido de α-pineno	22,12	2	—	—	—	—
664	1,54	1125	1134	[118]	1145	[108]	Óxido de limoneno (isômero)	1,71	9	—	—	—	—
744	1,64	1149	1153	[107]	1172	[38]	Óxido de nerol	2,56	2	—	—	—	—
848	2,20	1181	—	—	—	—	3,9-epoxi-p-menta-1,8(10)-dieno	1,42	4	—	—	—	—
Sub-total								8		0		0	
Área cromatográfica								8,61E+01	3	—		—	
% Área cromatográfica								2,03	4	—		—	
Éteres													
368	0,73	994	991	[107]	—	—	2,3-dehidro-1,8-cineol	2,94	3	—	—	—	—
432	0,77	1027	1033	[107]	1061	[38]	1,8-cineole	722,77	5	33,13	9	—	—
Sub-total								2		1		—	
Área cromatográfica								7,26E+02	5	3,31E+01	9	—	—
% Área cromatográfica								17,08	2	1,21	15	—	—
ÉSTERES (C ₁₁ , C ₁₂ e C ₁₃)													
968	1,45	1214	1223	[132]	—	—	Acetato de α-fenchilo	2,59	7	—	—	—	—
1264	1,90	1280	1285	[107]	—	—	Acetato de borneol (isômero)	4,62	3	—	—	—	—
1336	2,40	1294	1298	[133]	—	—	Acetato de 4(10)-tujen-3-ol	3,33	5	—	—	—	—
1344	1,69	1294	1294	[107]	—	—	Acetato de mentilo	—	—	—	—	12,18	13
1560	2,85	1333	—	—	—	—	Acetato de exo-2-hidroxicineole	30,54	1	—	—	—	—
1600	2,57	1340	1352	[136]	1359	[108]	Acetato de terpenilo	171,53	5	—	—	—	—
1656	2,13	1350	1354	[107]	1354	[108]	Acetato de citronelilo	—	—	2,41	5	—	—
1720	2,69	1363	1365	[107]	1379	[108]	Acetato de nerilo	—	—	124,63	13	—	—
1840	2,82	1383	1383	[107]	1386	[108]	Acetato de geranilo	25,93	5	102,70	6	—	—
2376	2,57	1473	1475	[107]	—	—	Propionato de geranilo	—	—	1,18	14	—	—
Sub-total								6		4		1	
Área cromatográfica								2,39E+02	4	2,31E+02	10	1,22E+01	13
% Área cromatográfica								5,61	4	8,42	3	0,46	8
Nº de compostos monoterpênicos oxigenados								41		15		1	
Área cromatográfica								2,68E+03	7	1,93E+03	9	1,22E+01	13
% Área cromatográfica								63,05	2	70,28	3	0,46	8
Nº de compostos terpênicos em C ₁₀								55		27		5	
Área cromatográfica								3,16E+03	7	2,68E+03	7	2,39E+01	9
Área cromatográfica (%)								74,37	1	97,85	0	0,90	5

4. Resultados e discussão

								ÓLEO ESSENCIAL					
¹Dtr (s)	²Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (ID)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do Composto	<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H. androsaemum</i> L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
COMPOSTOS SESQUITERPÊNICOS (C ₁₅)													
C ₁₅ HIDROCARBONETOS													
1552	1,14	1332	1351	[107]	1355	[19]	α-longipineno	—	—	—	—	13,58	8
1576	1,08	1336	1351	[107]	1354	[137]	α-cubebeno	—	—	—	—	1,78	6
1648	1,16	1349	1368	[107]	1382	[108]	Ciclo-sativeno	—	—	—	—	—	—
1680	1,13	1355	1373	[138]	1372	[19]	α-ilangeno	—	—	—	—	18,54	10
1696	1,08	1357	—	—	—	—	n.i. (m/z 105,91,119,161)	3,38	4	—	—	—	—
1704	1,17	1359	1376	[107]	1377	[137]	α-copaeno	1,80	2	—	—	42,72	6
1752	1,23	1367	1385	[107]	1397	[108]	β-bourboneno	0,24	2	—	—	3,57	8
1776	1,47	1372	1375	[107]	1393	[137]	β-elemenno (isómero)	—	—	—	—	8,63	10
1816	1,50	1379	1375	[107]	1393	[137]	β-elemenno (isómero)	—	—	—	—	8,87	5
1832	1,40	1382	1402	[107]	1398	[58]	α-longifoleno	—	—	—	—	5,65	3
1872	1,40	1389	1404	[107]	—	—	γ-cariofileno	—	—	—	—	1,29	8
1888	1,20	1392	1373	[126]	1380	[108]	Isolodeno (isómero)	11,06	9	—	—	—	—
1928	1,36	1399	1409	[107]	1421	[108]	α-gurjuneno	—	—	—	—	8,12	1
1936	1,47	1400	1418	[107]	1424	[19]	β-cariofileno	7,40	5	25,34	5	281,16	5
1952	1,29	1403	—	—	—	—	n.i. (m/z 105,91,79,119)	1,18	10	—	—	—	—
1960	1,31	1404	1438	[107]	1439	[137]	α-bergamoteno (isómero)	—	—	4,15	5	—	—
2000	1,39	1411	1432	[107]	1446	[108]	β-gurjuneno	17,55	3	—	—	—	—
2024	1,40	1415	—	—	—	—	n.i. (m/z 161,105,91,119)	—	—	—	—	5,84	2
2048	1,45	1419	1439	[107]	1485	[137]	Aromadendreno	182,69	2	—	—	26,82	7
2072	1,50	1423	—	—	1405	[108]	Sativeno	9,26	5	—	—	—	—
2088	1,53	1425	1430	[111]	—	—	γ-elemenno	—	—	—	—	50,18	8
2096	1,54	1427	1458	[143]	—	—	Aristoleno	—	—	—	—	2,59	6
2128	1,53	1432	—	—	—	—	n.i. (m/z 93,41,79,105,119,161)	—	—	—	—	129,81	8
2136	1,71	1433	1454	[121]	—	—	α-cariofileno	3,65	4	2,46	7	127,89	5
2168	1,55	1438	1461	[107]	1460	[19]	allo-aromadendreno	57,94	1	—	—	8,16	3
2184	1,72	1441	—	—	—	—	Dihidrocurcumenno	—	—	—	—	2,57	6
2240	1,65	1450	1447	[107]	1455	[19]	α-himachaleno	—	—	—	—	15,52	5
2248	1,35	1452	—	—	—	—	n.i. (m/z 105,91,41,77,119)	0,39	10	—	—	—	—
2248	1,58	1452	1443	[107]	1455	[137]	β-farneseno (isómero)	—	—	—	—	54,76	6
2256	1,54	1453	1473	[107]	1490	[108]	γ-gurjuneno	2,11	10	—	—	—	—
2272	1,61	1456	1440	[107]	—	—	β-humuleno	—	—	—	—	24,85	5
2280	1,60	1457	1438	[144]	—	—	γ-selineno	—	—	—	—	9,71	6
2296	1,65	1460	1485	[126]	1509	[137]	α-amorfenno	0,71	8	—	—	17,98	8
2312	1,66	1462	—	—	—	—	n.i. (m/z 93,105,133,119,161,204)	—	—	—	—	137,60	9
2320	1,83	1464	1485	[107]	—	—	β-selineno	3,78	4	—	—	111,42	8
2336	1,65	1466	1456	[145]	—	—	Dehidroaromadendreno	1,95	4	—	—	—	—
2360	1,58	1470	1458	[107]	1455	[137]	β-farneseno (isómero)	—	—	—	—	41,76	3
2360	1,81	1470	1454	[107]	1468	[108]	α-cloveno	—	—	—	—	5,83	5
2384	1,68	1474	1486	—	—	—	Eremofileno	—	—	—	—	56,52	4
2384	1,81	1474	1494	[107]	1513	[108]	α-selineno	—	—	—	—	165,16	5
2392	1,63	1475	1493	[107]	—	—	Ledeno	15,96	10	—	—	—	—
2400	1,83	1477	1494	[146]	1513	[108]	Biciclogermacreno	—	—	7,52	3	—	—
2448	1,74	1485	1499	[144]	1481	[137]	α-muroleno	0,25	9	0,47	4	14,21	8
2512	1,88	1495	1513	[107]	1520	[108]	γ-cadineno	1,28	4	—	—	—	—
2512	2,69	1495	—	—	—	—	4,5,9,10-dehidro-isolongifoleno	—	—	—	—	7,38	5
2536	1,69	1499	1509	[107]	1520	[108]	β-bisaboleno	—	—	4,36	6	—	—
2560	1,80	1503	1508	[107]	1505	[137]	α-farneseno	—	—	6,99	5	168,40	8
2576	1,65	1505	—	—	—	—	n.i. (m/z 91,105,119,41,161,55)	—	—	—	—	123,35	6
2576	2,35	1506	1532	[148]	1525	[137]	Calameneno	—	—	—	—	24,72	9
2592	1,81	1508	1524	[107]	1514	[19]	δ-cadineno	0,38	2	7,69	1	87,74	2
2616	1,90	1512	1491	[107]	1507	[108]	valenceno	—	—	—	—	262,20	8
2696	1,84	1525	1542	[107]	—	—	3,7-selinadieno	—	—	—	—	241,01	10
2712	1,78	1527	1518	[153]	—	—	α-panasinseno	—	—	—	—	2,79	5
2736	2,11	1531	1560	[118]	1578	[108]	Germacreno B	—	—	—	—	130,62	8
Sub-total								20		8		40	
Área cromatográfica								3,23E+02	2	5,90E+01	4	2,45E+03	4
% Área cromatográfica								7,60	4	2,15	6	92,60	0

4. Resultados e discussão

								ÓLEO ESSENCIAL					
¹ Dtr (s)	² Dtr (s)	R.I. calc. ^a	R.I. lit. ^b (1D)	Ref.	R.I. lit. ^c (2D)	Ref.	Nome do Composto	<i>E. globulus</i> L.		<i>C. limon</i> L.		<i>H.androsaemum</i> L.	
								Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV	Média (x 10 ⁵)	CV
COMPOSTOS SESQUITERPÊNICOS (C ₁₅) (cont.)													
C ₁₅ OXIGENADOS (cont.)													
Álcoois													
2768	4,00	1537	1532	[126]	—	—	Epiglobulol	96,75	5	—	—	—	—
2800	2,80	1542	1567	[150]	1593	[108]	Palustrol	6,49	6	—	—	—	—
2880	5,62	1555	1576	[107]	1576	[137]	Espatuleno	1,43	7	—	—	—	—
2920	4,48	1561	1576	[107]	1599	[19]	Globulol	491,38	9	—	—	—	—
2952	4,55	1566	1590	[107]	—	—	Viridiflorol	104,38	5	—	—	—	—
2976	4,00	1570	1595	[138]	1617	[108]	Guaiol	23,63	6	—	—	—	—
3016	3,52	1576	1565	[122]	1593	[108]	Ledol	19,66	8	—	—	—	—
3024	4,72	1578	1599	[151]	—	—	Rosifoliol	19,22	3	—	—	—	—
Sub-total								8		—		—	
Área cromatográfica								7,63E+02		8		—	
% Área cromatográfica								17,96		4		—	
Óxidos e epóxidos													
2896	3,17	1557	1606	[107]	1582	[19]	Óxido de cariofileno	3,18	4	—	—	138,46	6
2912	4,56	1560	—	—	—	—	α-bisaboleno epóxido	—	—	—	—	VT	—
3152	3,32	1598	1646	[145]	—	—	Óxido de <i>allo</i> -aromadendreno	—	—	—	—	7,95	8
Sub-total								1		—		3	
Área cromatográfica								3,18E+00		4		1,46E+02	
% Área cromatográfica								0,07		4		5,	
Cetonas													
3056	3,50	1583	—	—	—	—	Humuladienona	—	—	—	—	25,40	1
Sub-total								—		—		1	
Área cromatográfica								—		—		2,54E+01	
% Área cromatográfica								—		—		0,96	
Nº de compostos sesquiterpênicos oxigenados								9		—		4	
Área cromatográfica								7,66E+02		8		1,64E+02	
% Área cromatográfica								18,03		4		6,49	
Nº de compostos terpênicos em C ₁₅								29		8		44	
Área cromatográfica								1,09E+03		6		5,90E+01	
% Área cromatográfica								25,63		3		2,15	
TOTAL DE COMPOSTOS TERPÊNICOS EM C ₁₀ e C ₁₅								85		35		50	
TOTAL DE ÁREA CROMATOGRÁFICA								4,25E+03		6		2,74E+03	

a → índices de retenção calculados usando a série de alcanos C₈-C₂₀; b → índices de retenção referidos na literatura para colunas HP-5 ou equivalentes usando cromatografia em fase gasosa unidimensional; c → índices de retenção referidos na literatura para colunas HP-5 ou equivalentes usando cromatografia em fase gasosa bidimensional; n.i. → não identificado; — → ausente na amostra; VT → vestigial (presente apenas numa das 3 réplicas).

Relativamente ao índice de retenção (R.I.) absoluto observa-se uma diferença máxima de 50, correspondente a uma percentagem inferior a 5 % indicativa de que os valores de R.I. calculados são similares aos R.I. referidos na literatura (ver tabela 12). Quanto ao CV verifica-se que na maior parte dos casos este é inferior a 10 %. Os CVs mais elevados verificaram-se sobretudo em compostos que foram detectados apenas em duas réplicas.

Os monoterpenos do tipo hidrocarboneto localizam-se na 1ª dimensão entre os 288 e os 696 segundos e na segunda dimensão entre os 0,63 e os 1,26 segundos. Verifica-se que na gama em que se encontram os monoterpenos do tipo hidrocarboneto também aparecem

4. Resultados e discussão

compostos pertencentes a outras famílias como é o caso dos éteres 2,3-dehidro-1,8-cineol e 1,8-cineole e de vários óxidos/epóxidos — herbóxido; 2,3-epoxicarano; isómeros do óxido de linalol; óxido de α -pineno e óxido de limoneno. Os monoterpenos contendo oxigénio, pertencentes à família dos álcoois, localizam-se na primeira dimensão entre os 584 e os 1144 segundos e na segunda dimensão entre os 2,55 e os 7,25 segundos. Observando a figuras 28 é possível observar que região ocupada por esta família é bastante extensa. Dos monoterpenos contendo oxigénio os aldeídos começam a ser identificados no tempo de retenção 648; 1,88 s. O último aldeído a ser identificado encontra-se no tempo de retenção 1200; 3,78 s. Os monoterpenos oxigenados contendo grupo funcional cetona aparecem a partir do tempo de retenção 696; 2,36 s e terminam a 1080; 3,14 s. Os compostos monoterpénicos esterificados são identificados a partir de 968; 1,45 s até 2376; 2,57 s. Deste grupo fazem parte os acetatos (12 carbonos) e os proprionatos (13 carbonos) sendo que geralmente aparecem por esta ordem, devido ao número de carbonos que influencia a sua volatilidade. Os compostos terpénicos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto começam a ser identificados a partir do seguinte tempo de retenção: 1552; 1,14 s até ao tempo de retenção 2736; 2,11 s. O primeiro sesquiterpeno oxigenado a ser identificado surge aos 2768; 4,00 s e o último surge aos 3024; 4,72 s.

Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas podendo conter cerca de 20 a 60 compostos em concentrações muito diferentes sendo que dois ou três se encontram em concentrações bastante altas comparativamente a outros que às vezes estão presentes em quantidades vestigiais [6]. Pelos dados da tabela 14 temos que o óleo essencial de *E. globulus* L. possui um grande número de compostos, um número superior à gama definida por Bakkali *et al.* (2008) [6], o que era expectável uma vez que em vez de cromatografia unidimensional se usou cromatografia bidimensional. Já em relação aos óleos essenciais de *C. limon* L. e *H. androsaemum* L. o número de compostos identificados está na gama definida por Bakkali *et al.* (2008) [6], 35 compostos e 48, respectivamente.

Na figura 30 encontram-se os gráficos de barras referentes a alguns dos compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ identificados nos óleos essenciais, obtidos através de destilação por arrastamento de vapor, das folhas secas de *E. globulus* L., das folhas frescas de *C. limon* L., e da amostra comercial de *H. androsaemum* L. (que contém toda a parte aérea da planta, ou seja, folhas, flores e caules) em função da área cromatográfica, expressa em unidades

4. Resultados e discussão

arbitrárias (u.a). Tendo em conta que foram identificados muitos compostos apresentam-se apenas aqueles cuja área cromatográfica é maior que 100×10^5 u.a.

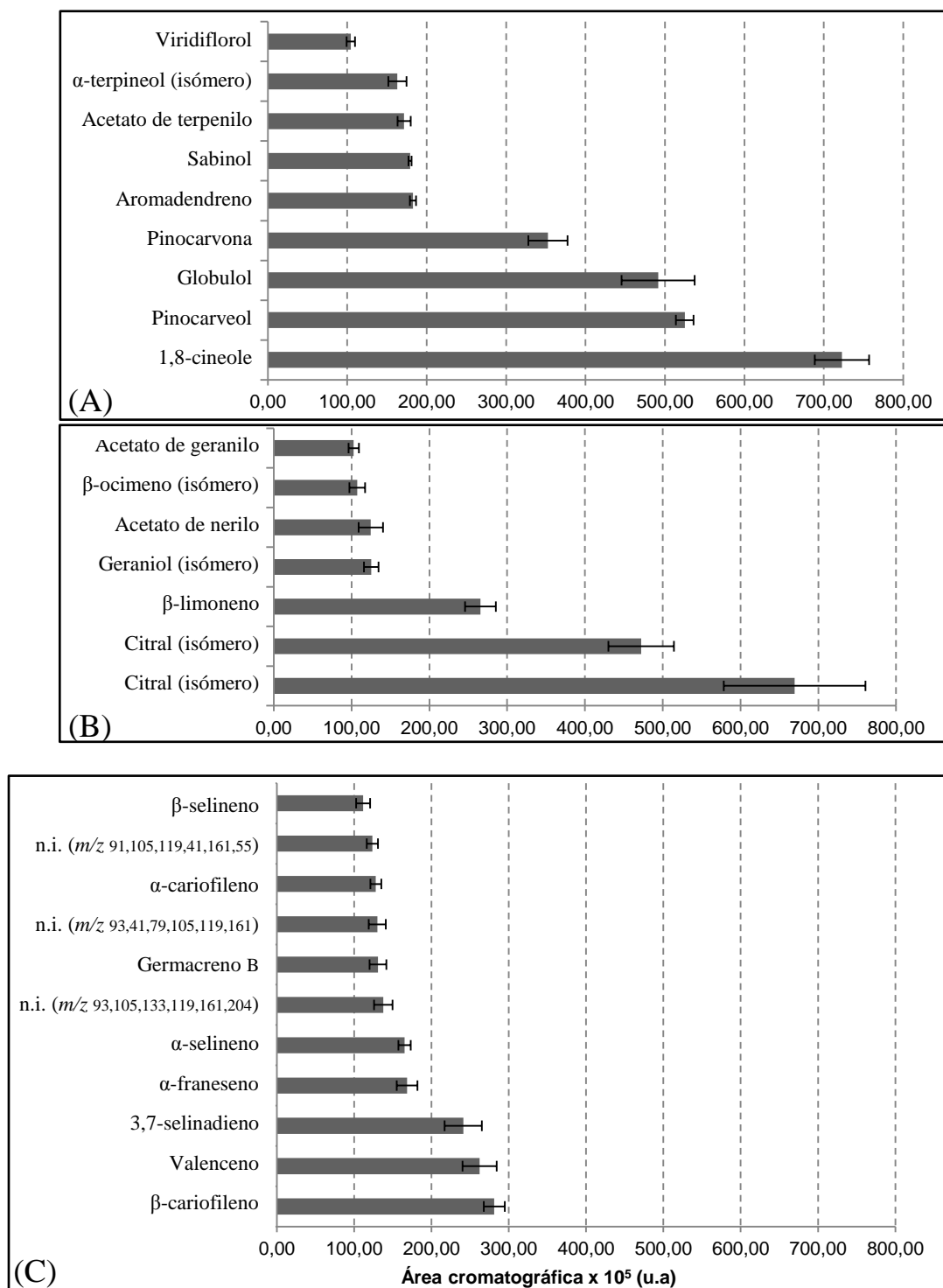


Figura 30 — Compostos terpénicos em C₁₀ e em C₁₅ presentes nos óleos essenciais, obtidos através de destilação por arrastamento de vapor, das folhas secas de *E. globulus* L. (A), das folhas frescas de *C. limon* L. (B) e da amostra comercial de *H. androsaemum* L. (C) em função da área cromatográfica expressa em unidades arbitrárias (u.a).

4. Resultados e discussão

Analisando a figura 30 (A e B) verifica-se que de facto, como já tinha sido referido por Bakkali *et al.* em 2008 [6] os óleos essenciais de *E. globulus* L. e *C. limon* L. são constituídos por um pequeno número de compostos que se encontram em concentrações bastante altas e um grande número de compostos que se encontram em concentrações reduzidas. É possível observar que no óleo essencial das folhas secas de *E. globulus* L. existem quatro compostos que se encontram em concentrações bastante mais elevadas comparativamente aos outros, esses compostos são o 1,8-cineole ($722,77 \times 10^5$, o que em termos percentuais corresponde a 17,01 % de todos os compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅ que se identificaram), o pinocarveol ($524,96 \times 10^5$; 12,36 %), o globulol ($491,38 \times 10^5$; 11,97 %) e a pinocarvona ($352,58 \times 10^5$; 8,30 %). Na literatura os resultados para os compostos maioritários não são exactamente os mesmos, segundo Maciel *et al.* (2010) [70] o óleo essencial das folhas de *E. globulus* L. é constituído por 1,8-cineole (83,89 %), limoneno (8,16 %), α -pineno (4,15 %) e *o*-cimeno (2,93 %). Estas diferenças em relação aos resultados obtidos neste trabalho podem ser explicadas pelo facto de as folhas usadas neste trabalho terem sido cultivadas em zonas geográficas diferentes e colhidas em anos e épocas do ano diferentes. Dos quatro compostos maioritários no presente trabalho todos contêm oxigénio e três pertencem ao grupo dos monoterpenos e apenas 1 pertence ao grupo dos sesquiterpenos. Os resultados são pois coerentes com a literatura na qual se refere os monoterpenos como componentes predominantes e o 1,8-cineole como o composto principal [154] [13] [155] [72]. O 1,8-cineole foi o composto maioritário identificado neste óleo essencial pelo que esta planta é uma boa fonte deste composto. Na literatura é referida a actividade antifúngica contra *A. flavus* e *A. parasiticus* [72], actividade antiviral contra o vírus herpes simplex do tipo 1 *in vitro* [156], actividade inibitória sobre a produção de citocinas durante a resposta inflamatória [79] e indução da fragmentação do ADN bem como a inibição da síntese de ADN em células eucariotas [80]. O número elevado de componentes identificados (85 no total), incluindo 29 compostos sesquiterpénicos, no óleo testado pode ser explicado devido ao tempo de hidrodestilação, cerca de 4 h uma vez que o óleo das folhas de *E. globulus* L. obtido por hidrodestilação por mais de 1h pode ter mais componentes e um maior número de sesquiterpenos em comparação com óleo destilado por 1h [155].

Relativamente ao óleo essencial de *C. limon* L., existem três compostos que estão em quantidades bastante mais elevadas quando comparados aos outros: isómeros do citral

4. Resultados e discussão

(669,57 x 10⁵; 24,42 % e 1754,14 x 10⁵; 17,23 %) e β -limoneno (265,56 x 10⁵; 19,81 %). Na literatura os resultados não são exactamente os mesmos, segundo Lota *et al.* (2002) [85] o composto maioritário foi o β -pineno (23,8 %) e só depois o limoneno (19,1 %), o geranial (15,9 %) e o neral (11,6 %). O facto de o β -pineno ser o composto maioritário no óleo obtido por Lota *et al.* (2002) [85] e no óleo obtido no presente trabalho se encontrar apenas numa percentagem de 2,04 % poderá ser explicado tendo em conta as diferenças na amostra usada nos dois trabalhos. Dos três compostos maioritários identificados no presente trabalho todos pertencem ao grupo dos monoterpenos, sendo que dois deles são oxigenados. Vekiari et al., 2002 [16] verificaram que a maioria dos constituintes do óleo pertencia à família dos terpenos e que estes podiam ser organizados em dois grupos: o dos hidrocarbonetos terpénicos (monoterpenos e sesquiterpenos) e o dos compostos monoterpénicos oxigenados. Os autores verificaram que o segundo grupo era o predominante, tal como acontece no trabalho presente. Na planta seca de *C. limon* L. os isómeros do citral e o β -cariofileno foram os compostos maioritários identificados. No respectivo óleo essencial os isómeros do citral também foram os compostos maioritários e assim verifica-se que esta planta é uma boa fonte destes compostos. Na literatura o citral foi referido como tendo actividade antiviral contra o vírus herpes simplex do tipo 1 *in vitro* [156], actividade antimicrobiana contra *Saccharomyces cerevisiae* [157], actividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum cubense*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris sp.* e *Alternaria alternata* [158].

Pela observação a figura 30 (C) verifica-se que no óleo essencial de *H. androsaemum* L., os compostos, mesmo os maioritários, estão em quantidades inferiores às verificadas para os óleos essenciais de *E. globulus* L. e *C. limon* L.. No óleo essencial de *H. androsaemum* L. os compostos que apresentam maior área cromatográfica e consequentemente uma maior percentagem) são: β -cariofileno (281,16 x 10⁵; 11,24 %), valenceno (262,20 x 10⁵; 10,49 %), 3,7-selinadieno (241,01 x 10⁵; 9,64 %), α -farneseno (168,40 x 10⁵; 6,63 %) e o α -selineno (165,16 x 10⁵; 6,60 %). No caso deste óleo não se verifica a existência de um pequeno número de compostos em quantidades muito elevadas, como tinha sido referido por Bakkali *et al.* em 2008 [6] relativamente a óleos essenciais. De facto existe um grande número de compostos presentes em quantidades consideráveis e um número mais reduzido de compostos em quantidades menores. Em trabalhos anteriores verificou-se que os óleos de *H. androsaemum* L., independentemente da época de colheita, eram ricos em compostos

4. Resultados e discussão

sesquiterpénicos, principalmente do tipo hidrocarboneto, que representavam entre 40 a 78 % do total dos compostos do óleo essencial [20 e 22]. No presente trabalho o óleo analisado também mostrou ser rico em compostos sesquiterpénicos do tipo hidrocarboneto (representando cerca de 92 % do total de compostos terpénicos em C₁₀ e C₁₅). Nesta planta seca o composto maioritário foi o β -cariofileno e foi também o composto mais abundante extraído para o óleo essencial por destilação por arrastamento de vapor e portanto esta planta é uma boa fonte deste composto. Na literatura é referido que o β -cariofileno tem mostrado actividade anti-inflamatória em vários modelos animais [159], actividade antitumoral [160], parece ter efeito citoprotector gástrico em ratos [161] e tem uma acção anestésica local forte [162].

Os compostos terpénicos (C₁₀ e C₁₅) que foram identificados para cada um dos óleos essenciais alvo de estudo no presente trabalho encontram-se na tabela 15 em comparação com os resultados relatados na literatura. Tendo em conta que no presente trabalho não foi possível determinar o nome de alguns compostos estes não são tidos em conta na elaboração da tabela 15 que se segue.

4. Resultados e discussão

Tabela 15 — Compostos terpênicos (C₁₀ e C₁₅) presentes nos óleos essenciais de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L.: (a) — identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS no presente trabalho; Lit. — reportados na literatura em trabalhos anteriores. ([] — indicação das referências bibliográficas; () — n° de isômeros identificados).

Nome do Composto	ÓLEO ESSENCIAL					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS (C₁₀)						
C₁₀ HIDROCARBONETOS						
1,3,8-p-mentatrieno	x	—	—	—	—	—
Canfeno	x	[71]	x	[16] [85]	—	—
<i>allo</i> -ocimeno	—	—	x	—	—	—
<i>o</i> -cimeno	x	[72] [70]	—	—	x	—
<i>p</i> -cimeno	x	[71]	—	[85]	—	—
Verbeneno	x	—	—	—	—	—
α -felandreno	x	[71]	—	[85]	—	—
α -pineno	x	[71] [70]	x	[16] [85]	x	[20] [22]
α -terpineno	x	[71]	x	[16] [85]	—	—
α -terpinoleno	x	[71] [72]	x	[16] [85]	—	[20]
β -limoneno	x	[71] [70]	x	[16] [85]	x	[20] [22]
β -mirceno	x	[71] [72]	x	[16] [85]	—	[20]
β -ocimeno (isômeros)	x (2)	[71] (1)	x (2)	[16] [85] (2)	—	[20] (1)
β -pineno	x	[71] [72]	x	[16] [85]	x	[20]
γ -terpineno	x	[71] [72]	x	[16] [85]	—	[20]
δ -3-careno	—	—	x	[16]	—	—
Sub-total (n° de compostos)	15	12	12	13	4	7
Novos compostos	2		1		1	
C₁₀ OXIGENADOS						
Álcoois						
1,8-mentadien-4-ol	x	—	—	—	—	—
2,6-dimetil-1,5,7-octatrieno-3-ol	x	—	—	—	—	—
2-careno-4-ol	—	—	x	—	—	—
4-terpineol	x	[71] [72]	x	[16] [85]	—	—
6-canfenol	x	—	—	—	—	—
Carveol (isômeros)	x (2)	—	—	—	—	—
Borneol	x	[71]	—	—	—	—
Geraniol (isômeros)	x (1)	[71] (1)	x (2)	[85] (2)	—	—
Hidrato de canfeno	x	—	—	—	—	—
Linalool	x	[71]	x	[16] [85]	—	—
Mirtenol	x	—	—	—	—	—
Pinocarveol	x	[71] [72]	—	—	—	—
Sabinol	x	—	—	—	—	—
Verbenol (isômeros)	x (1)	—	—	—	—	—
α -terpineol (isômeros)	x (2)	[71] [72] (1)	x (2)	[16] [85] (1)	—	—
β -citronelol	—	—	x	[85]	—	—
β -fenchol	x	—	—	—	—	—
Sub-total (n° de compostos)	17	6	8	6	0	0
Novos compostos	11		2		0	
Aldeídos						
Citral (isômeros)	—	—	x (2)	[16] [85] (2)	—	—
Mirtenal	x	—	—	—	—	—
α -Canfolenal	x	—	—	—	—	—
β -Citronelal	—	[72]	x	[16] [85]	—	—
Sub-total (n° de compostos)	2	1	3	3	0	0
Novos compostos	2		0		0	
Cetonas						
2-metil-6-metileno-1,7-Octadien-3-ona	x	—	—	—	—	—
Carvona	x	—	—	—	—	—
Carvotanacetona	x	—	—	—	—	—
Pinocanfona (isômeros)	x (2)	—	—	—	—	—
Pinocarvona	x	—	—	—	—	—
Sub-total (n° de compostos)	6	0	0	0	0	0
Novos compostos	6		0		0	

4. Resultados e discussão

Nome do Composto	ÓLEO ESSENCIAL					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₀ OXIGENADOS (cont.)						
Óxidos/epóxidos						
2,3-epoxicarano	x	—	—	—	—	—
3,9-epoxi-p-menta-1,8(10)-dieno	x	—	—	—	—	—
Epoxi-ocimeno	x	—	—	—	—	—
Herbóxido	x	—	—	—	—	—
Óxido de limoneno	x	—	—	—	—	—
Óxido de linalool	x	—	—	—	—	—
Óxido de Nerol	x	—	—	—	—	—
Óxido de α -Pino	x	—	—	—	—	—
Sub-total (nº de compostos)	8	0	0	0	0	0
Novos compostos	8		0		0	
Éteres						
1,8-cineole	x	[71] [72] [70]	x	[85]	—	[20]
2,3-dehidro-1,8-cineol	x	—	—	—	—	—
Sub-total (nº de compostos)	2	1	1	1	0	1
Novos compostos	1		0		0	
Ésteres (C₁₁, C₁₂ e C₁₃)						
Acetato de 4(10)-tujen-3-ol	x	—	—	—	—	—
Acetato de borneol	x	—	—	—	—	—
Acetato de citrônio	—	—	x	[16] [85]	—	—
Acetato de exo-2-hidroxicineole	x	—	—	—	—	—
Acetato de geranilo	x	—	x	[16] [85]	—	—
Acetato de mentilo	—	—	—	—	x	—
Acetato de nerilo	—	—	x	[16] [85]	—	—
Acetato de terpenilo	x	—	—	—	—	[20]
Acetato de α -fenchilo	x	—	—	—	—	—
Propionato de geranilo	—	—	x	[16]	—	—
Sub-total (nº de compostos)	6	0	4	4	1	1
Novos compostos	6		0		1	
Nº de compostos C₁₀ oxigenados	41	8	16	13	1	2
Novos compostos C₁₀ oxigenados	34		3		0	
Nº de compostos C₁₀	56	20	28	25	5	9
Novos compostos C₁₀	36		5		2	
COMPOSTOS SESQUITERPÉNICOS (C₁₅)						
C₁₅ HIDROCARBONETOS						
3,7-selinadieno	—	[71]	—	—	x	—
4,5,9,10-dehidro-isolongifoleno	—	—	—	—	x	—
<i>allo</i> -aromadendreno	x	[71]	—	—	x	[20]
Aristoleno	—	—	—	—	x	—
Aromadendreno	x	[71]	—	—	x	—
Biciclogermacreno	—	—	x	—	—	—
Calameneno	—	—	—	—	x	—
Ciclo-sativeno	—	—	—	—	x	—
Dehidro-aromadendreno	x	—	—	—	—	—
Dihidro-curcumeno	—	—	—	—	x	—
Eremofileno	—	—	—	—	x	—
β -farneseno (isômeros)	—	—	—	—	x (2)	[22] (1)
Germacreno B	—	—	—	—	x	[20]
Isoledeno	x	—	—	—	—	—
Ledeno	x	[71]	—	—	—	—
Sativeno	x	—	—	—	—	—
Valenceno	—	—	—	—	x	[22]
α -amorfoleno	x	—	—	—	x	—
α -bergamoteno	—	—	x	[16]	—	[20]
α -cariofileno	x	[71]	x	[16]	x	—
α -cloveno	—	—	—	—	x	—
α -copaeno	x	—	—	—	x	[20] [22]
α -cubebeno	—	—	—	—	x	—
α -farneseno	—	—	x	[16]	x	[20] [22]
α -gurjuneno	—	—	—	—	x	—

4. Resultados e discussão

Nome do Composto	ÓLEO ESSENCIAL					
	<i>E. globulus</i>		<i>C. limon</i>		<i>H. androsaemum</i>	
	(a)	Lit.	(a)	Lit.	(a)	Lit.
C₁₅ HIDROCARBONETOS (cont.)						
α -himachaleno	—	—	—	—	x	—
α -ilangeno	—	—	—	—	x	[20]
α -longifoleno	—	—	—	—	x	—
α -longipineno	—	—	—	—	x	—
α -muuroleno	x	—	x	—	x	[20]
α -panasinseno	—	—	—	—	x	—
α -selineno	—	—	—	—	x	[20]
β -bisaboleno	—	—	x	—	—	—
β -bourboneno	x	—	—	—	x	[20] [22]
β -cariofileno	x	—	x	[85]	x	[20] [22]
β -elemeno	—	—	—	—	x	[20]
β -gurjuneno	x	[71]	—	—	—	[20] [22]
β -humuleno	—	—	—	—	x	[20]
β -selineno	x	—	—	—	x	[22]
γ -cadineno	x	[71]	—	—	—	[22]
γ -cariofileno	—	—	—	—	x	—
γ -elemeno	—	—	—	—	x	[20]
γ -gurjuneno	x	—	—	—	—	—
γ -selineno	—	—	—	—	x	[20] [22]
δ -cadineno	x	—	x	—	x	[20]
Sub-total (nº de compostos)	17	7	8	4	36	20
Novos compostos	11		4		19	
C₁₅ OXIGENADOS						
Álcoois						
Epiglobulol	x	—	—	—	—	—
Espatuleno	x	[71]	—	—	—	—
Globulol	x	[71]	—	—	—	—
Guaiol	x	[71]	—	—	—	—
Ledol	x	—	—	—	—	—
Palustrol	x	—	—	—	—	[22]
Rosifoliol	x	—	—	—	—	—
Viridiflorol	x	[71]	—	—	—	—
Sub-total (nº de compostos)	8	4	0	0	0	1
Novos compostos	4		0		0	
Óxidos/epóxidos						
Óxido de <i>allo</i> -aromadendreno	—	—	—	—	x	[22]
Óxido de cariofileno	x	[71]	—	[16]	x	[20] [22]
α -bisaboleno epóxido	—	—	—	—	x	—
Sub-total (nº de compostos)	1	1	0	1	3	2
Novos compostos	0		0		1	
Cetonas						
Humuladienona	—	—	—	—	x	—
Sub-total (nº de compostos)	0	0	0	0	1	0
Novos compostos	0		0		1	
Nº de compostos C₁₅ oxigenados	9	5	0	1	4	3
Novos compostos C₁₅ oxigenados	4		0		2	
Nº de compostos C₁₅	26	12	8	5	40	23
Novos compostos C₁₅	15		4		21	
Nº de compostos C₁₀ e C₁₅	82	32	36	30	45	32
Novos compostos C₁₀ e C₁₅	51		9		23	

- x → identificado no presente trabalho;
 — → não identificado no presente trabalho/em trabalhos anteriores;
 [] → indicação da(s) referência(s) onde foi referido o composto;
 () → indicação do nº de isómeros identificados;

4. Resultados e discussão

À semelhança do verificado na comparação dos resultados deste trabalho com os relatados na literatura para as plantas secas, observa-se na tabela 15 que:

- ✓ há um pequeno número de compostos, referido previamente na literatura, que não foi identificado no presente trabalho;
- ✓ alguns compostos foram anteriormente referidos na literatura e foram também identificados no presente trabalho;
- ✓ alguns compostos foram identificados pela primeira vez no presente trabalho.

O β -citronelal e o 3,7-selinadieno foram referidos na literatura como constituintes do óleo essencial de *E. globulus* L. mas não foram identificados no óleo essencial obtido neste trabalho. Todos os outros compostos já relatados na literatura foram identificados no óleo essencial obtido neste trabalho tendo sido possível identificar ainda 51 compostos novos, dos quais 2 compostos terpénicos em C_{10} do tipo hidrocarboneto, 34 compostos em C_{10} oxigenados, 11 compostos em C_{15} do tipo hidrocarboneto e 4 compostos em C_{15} oxigenados. Verifica-se que nos compostos C_{10} foi possível identificar mais compostos contendo oxigénio (sobretudo álcoois) enquanto nos compostos em C_{15} se identificaram mais compostos do tipo hidrocarboneto. No que diz respeito ao óleo essencial de *C. limon* L. analisado neste trabalho não foi possível identificar o *p*-cimeno, o α -felandreno e o óxido de cariofileno anteriormente identificados na literatura. Todos os outros compostos relatados na literatura foram identificados. Com o presente trabalho foram também identificados 9 compostos novos sendo que 2 foram monoterpenos não contendo oxigénio, 3 monoterpenos contendo oxigénio (álcoois) e 4 sesquiterpenos não oxigenados. Quanto ao *H. androsaemum* L. vários compostos relatados anteriormente na literatura não foram identificados no óleo obtido neste trabalho (α -terpinoleno, β -mirceno, isómero do β -ocimeno, γ -terpineno, 1,8-cineole, acetato de terpenilo, α -bergamoteno, β -gurjuneno, γ -cadineno e palustrol). Os outros compostos relatados na literatura foram identificados, tendo sido possível identificar, ainda, 23 novos compostos novos e, destes, a maior parte pertence ao grupo dos compostos terpénicos em C_{15} do tipo hidrocarboneto. De um modo geral, tendo em conta os óleos essenciais obtidos por destilação por arrastamento de vapor das três espécies de plantas em estudo no presente trabalho, foi possível identificar mais compostos terpénicos em C_{10} e C_{15} do que em qualquer um dos trabalhos realizados anteriormente. No caso dos óleos essenciais de *E. globulus* L. e de *C. limon* L. foram

4. Resultados e discussão

identificados mais compostos monoterpénicos do que sesquiterpénicos. No caso dos monoterpénicos foram identificados mais compostos contendo oxigénio, acontecendo o oposto para o caso dos compostos sesquiterpénicos. No que toca ao óleo essencial de *H. androsaemum* L. verifica-se uma tendência diferente da apresentada pelos outros dois óleos pois dos 23 novos compostos identificados 21 são sesquiterpénicos e apenas 2 são monoterpénicos. Dos compostos sesquiterpénicos 19 não possuem oxigénio na sua constituição e apenas 2 são oxigenados.

O facto de terem sido identificados mais compostos terpénicos em C₁₀ contendo oxigénio nos óleos de *E. globulus* L. e de *C. limon* L. também é um aspecto positivo, uma vez que os compostos terpénicos contendo oxigénio são descritos na literatura como possuindo maiores efeitos biológicos, nomeadamente propriedades antimicrobianas [163]. Quanto ao óleo de *H. androsaemum* L. o maior número de compostos identificados pertence ao grupo dos compostos terpénicos em C₁₅ do tipo hidrocarboneto. Este tipo de compostos é referido na literatura como sendo importantes compostos bioactivos, nomeadamente antioxidantes [164], insecticidas [165], anti-HIV [166], anti-inflamatórios [166, 167], antibacterianos [168, 169, 170 e 171], anticancerígenos [172 e 173] e citotóxicos [174]. Além disso os sesquiterpenos contribuem positivamente para a acção de antibióticos [165].

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho é possível afirmar que o uso da cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa por tempo de voo foi uma mais-valia.

4.3. Avaliação da actividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método de DPPH[•]

Os compostos com actividade antioxidante têm sido alvo de muito interesse. Tendo em conta o interesse demonstrado por este tipo de compostos e que alguns estudos já demonstraram que os óleos essenciais possuem compostos com este efeito benéfico torna-se pertinente estudar os óleos essenciais obtidos a partir das três plantas em estudo neste trabalho quanto ao seu potencial antioxidante. Para tal recorreu-se ao método de DPPH[•].

Para fazer uma curva de calibração para o DPPH[•] foram preparadas diferentes soluções de DPPH[•] em metanol, numa gama de concentrações compreendida entre 0 µM e 140 µM. (0, 21, 42, 63, 77,98, 119 e 140 µM). Procedeu-se então à execução de um gráfico das absorvâncias (a 515 nm) registadas em função de cada concentração estudada tendo-se

4. Resultados e discussão

verificado que a recta apresenta uma correlação de 0,9972, como se pode comprovar pela análise da figura 31.

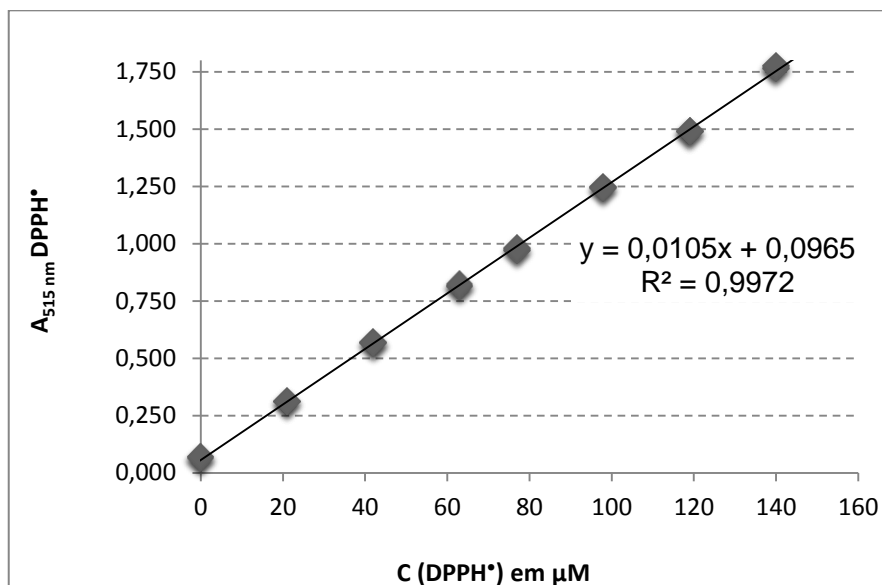


Figura 31 — Curva de calibração de DPPH*.

A actividade antioxidante para o ácido gálico foi determinada já que este é considerado um antioxidante de referência [106] e, para isso, foram preparadas várias soluções de ácido gálico em metanol com as seguintes concentrações: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 mg de ácido gálico/L. Foram efectuados gráficos de percentagem de DPPH* restante em função do tempo de reacção tendo em conta a absorvância no tempo zero ($t=0$) e o valor de absorvância medida no decorrer da reacção. Foram realizados gráficos de percentagem DPPH* restante em função da concentração de ácido gálico usada de modo a determinar o seu valor de EC_{50} (figura 32).

4. Resultados e discussão

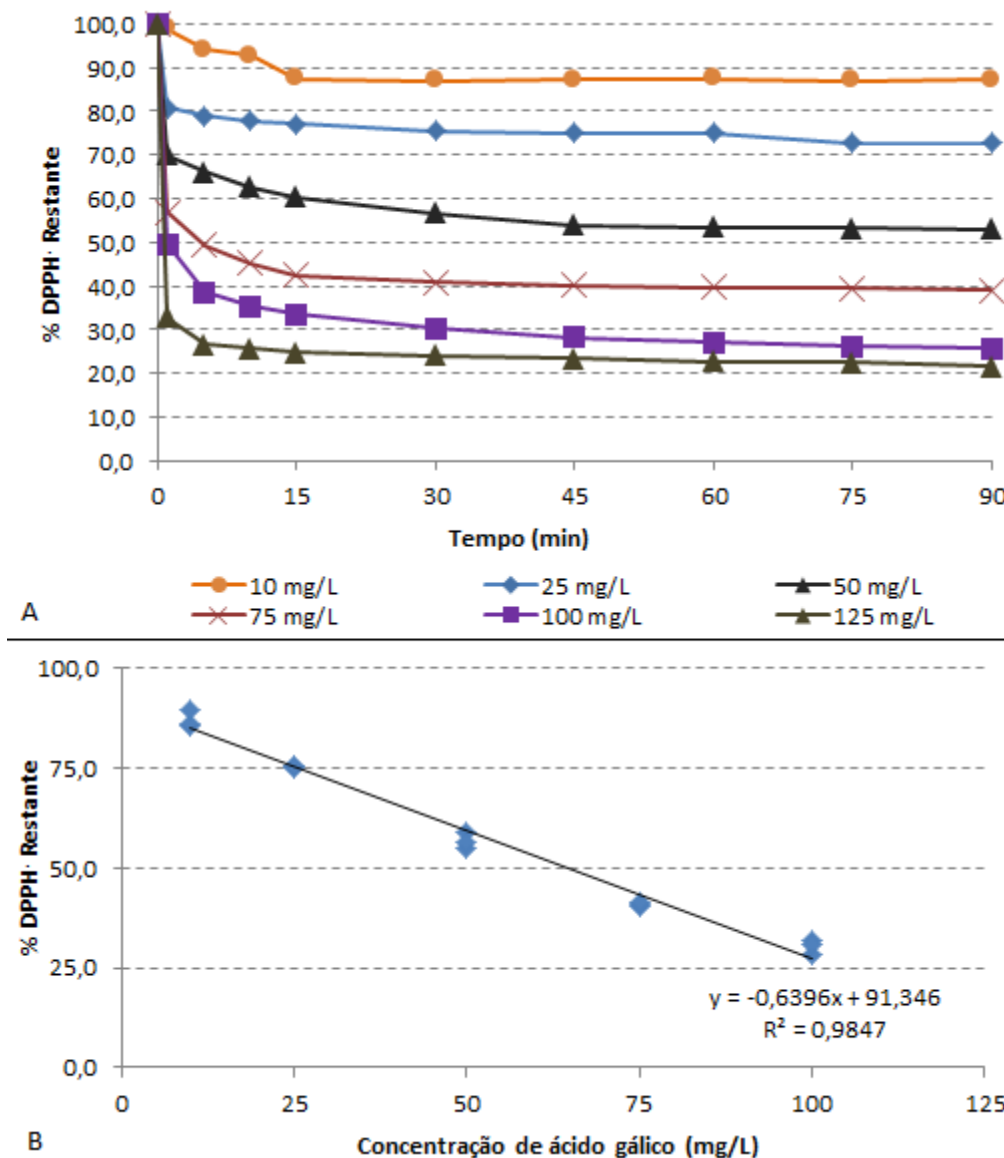


Figura 32 — A: Comportamento cinético do ácido gálico; B: Inibição do radical livre DPPH• por soluções de diferentes concentrações de ácido gálico (30 min).

A partir da equação obtida no gráfico da percentagem de DPPH• restante em função da concentração de ácido gálico (Figura 32-B) calculou-se o EC₅₀, cujo valor obtido foi de 64,63 mg/L, ou seja, é necessária uma concentração de 64,63 mg/L para reduzir para 50 % a concentração inicial de DPPH•.

Para cada óleo essencial em estudo foram também efectuados gráficos de percentagem de DPPH• restante em função do tempo de reacção tendo em conta a absorvância no tempo zero (t=0) e o valor de absorvância medida no decorrer da relação bem como gráficos de percentagem DPPH• restante em função da concentração de cada óleo essencial usada de modo a determinar o valor do EC₅₀. Nas figuras 33 e 34 encontram-se os gráficos

4. Resultados e discussão

referentes à cinética da reacção para os óleos essenciais de *E. globulus* L. e de *C. limon* L. e o gráfico relativo à percentagem de DPPH[•] restante em função da concentração de óleo essencial utilizada.

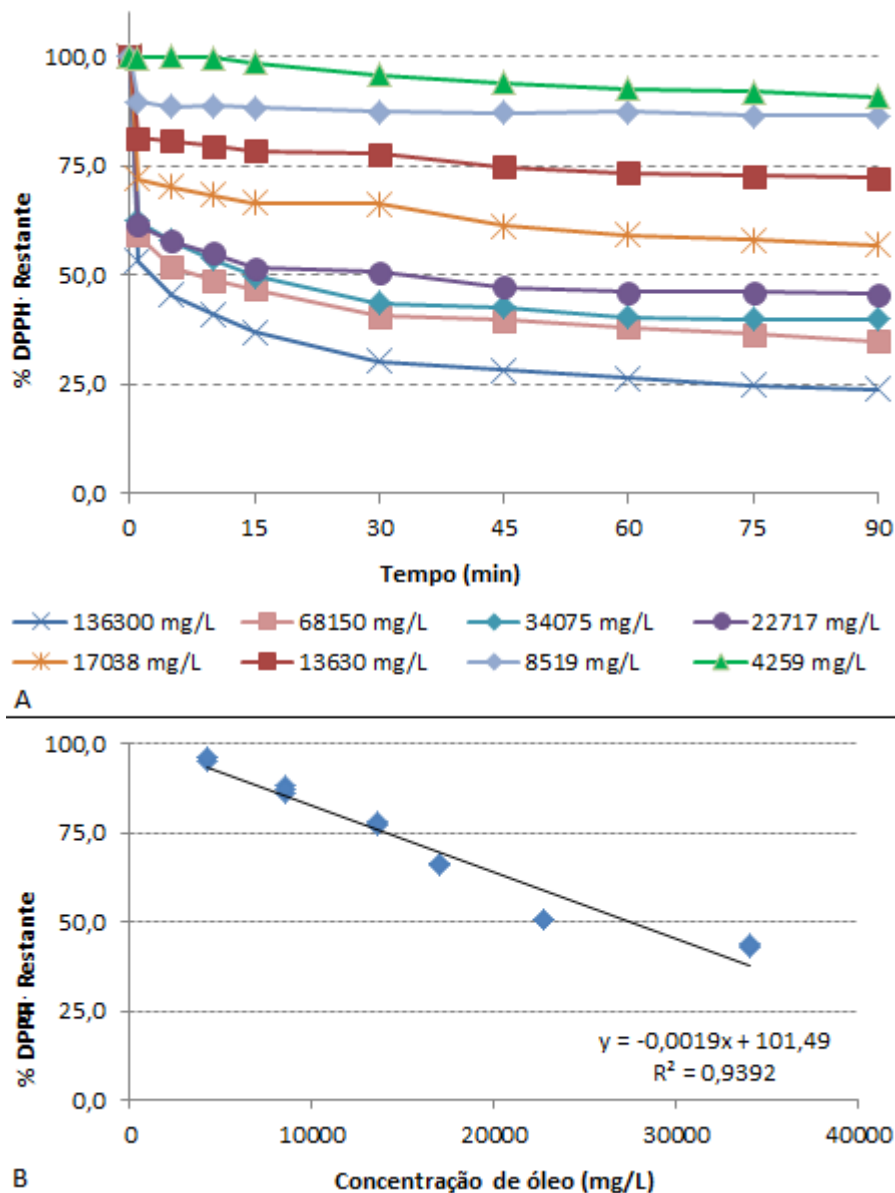


Figura 33 — A: Comportamento cinético do óleo essencial de *E. globulus* L.; B: Inibição do radical livre DPPH[•] por soluções de diferentes concentrações de óleo essencial.

Para o caso óleo essencial de *E. globulus* L. foram efectuadas oito concentrações diferentes (136300, 68150, 34075, 22717, 17038, 13630, 8519 e 4259 mg/L) a partir do óleo essencial puro obtido das folhas secas usando destilação por arrastamento de vapor. Estudou-se o comportamento cinético utilizando várias concentrações de modo a obter curvas acima e abaixo de 50 % de DPPH[•] restante. A partir da equação obtida no gráfico da

4. Resultados e discussão

percentagem de DPPH[•] restante em função da concentração de óleo essencial (Figura 33-B) calculou-se o EC₅₀, cujo valor obtido foi de 27100 mg/L, ou seja, é necessária uma concentração de 27100 mg/L para reduzir para 50 % a concentração inicial de DPPH[•].

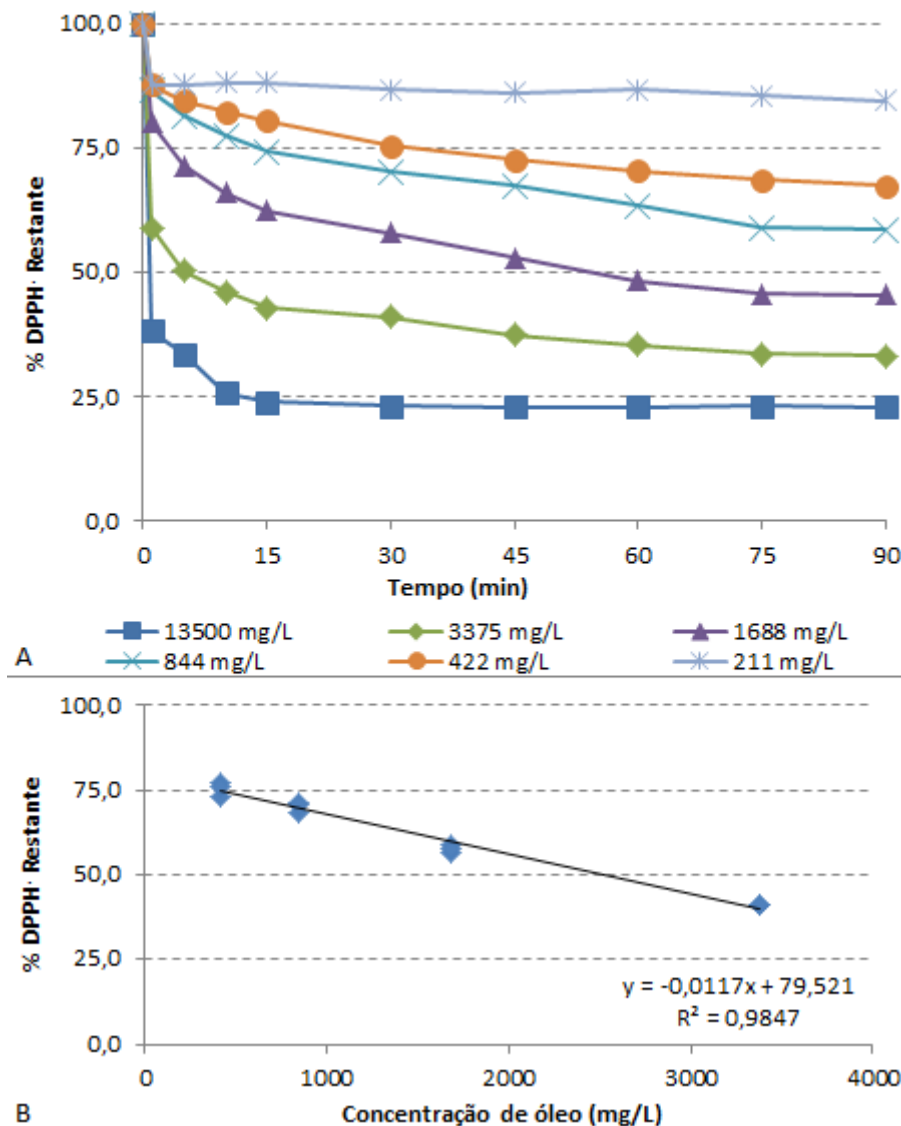


Figura 34 — A: Comportamento cinético do óleo essencial de *C. limon* L.; B: Inibição do radical livre DPPH[•] por soluções de diferentes concentrações de óleo essencial.

Quanto ao óleo essencial de *C. limon* L. foram efectuadas seis concentrações diferentes (13500, 3375, 1688, 844, 422 e 211 mg/L) a partir do óleo essencial puro obtido através de destilação por arrastamento de vapor das folhas frescas. Destas seis concentrações três encontravam-se acima de 50 % de DPPH[•] restante e três encontravam-se abaixo. A partir da equação obtida no gráfico da percentagem de DPPH[•] restante em função da concentração de óleo essencial (figura 34-B) calculou-se o EC₅₀, cujo valor obtido foi de

4. Resultados e discussão

2523 mg/L, ou seja, é necessária uma concentração de 2523 mg/L para reduzir para 50 % a concentração inicial de DPPH^{*}. Calculou-se também a eficiência anti-radicalar (AE) do ácido gálico e dos óleos essenciais de *E. globulus* L. e de *C. limon* L. utilizando para isso a seguinte equação matemática: $AE = 1/(EC_{50} \times t_{EC_{50}})$, em que EC_{50} é o valor determinado anteriormente e $t_{EC_{50}}$ diz respeito ao tempo em que se verifica o valor de EC_{50} . Aplicando esta equação ao ácido gálico têm-se uma eficiência anti-radicalar de $4,42 \times 10^{-4}$ que se tratando de um valor inferior a 1×10^{-3} indica que a cinética desta reacção é lenta. Quanto ao óleo essencial de *E. globulus* L. obteve-se como valor de eficiência anti-radicalar $6,36 \times 10^{-7}$. Sendo um valor inferior a 1×10^{-3} considera-se, portanto, que a sua cinética é lenta. Por sua vez ao aplicar esta equação ao óleo essencial de *C. limon* L. obteve-se como valor de AE $6,01 \times 10^{-6}$. A cinética deste óleo é portanto lenta pois a AE é inferior a 1×10^{-3} . A tabela 16 inclui os dados relativos aos óleos essenciais analisados e os que dizem respeito ao ácido gálico. Para o caso do óleo essencial de *H. androsaemum* L. a actividade antioxidante não foi avaliada uma vez que a quantidade obtida aquando da destilação por arrastamento de vapor não foi suficiente para efectuar as diluições necessárias para a determinação do EC_{50} através do método de DPPH^{*}.

Tabela 16 — Valores de EC_{50} , AE e respectiva classificação da cinética para os óleos essenciais analisados neste estudo.

		EC_{50} (mg/L)	AE	Classificação da cinética
Ácido gálico		65	$4,42 \times 10^{-4}$	lenta
Óleo essencial	<i>E. globulus</i> L.	27100	$6,36 \times 10^{-7}$	lenta
	<i>C. limon</i> L.	2523	$6,01 \times 10^{-6}$	lenta
	<i>H. androsaemum</i> L.*	-	-	-

*a actividade antioxidante não foi avaliada para o óleo essencial de *H. androsaemum* L. uma vez que a quantidade obtida aquando da destilação por arrastamento de vapor não foi suficiente para efectuar as diluições necessárias para a determinação do EC_{50} através do método de DPPH^{*}.

Comparando os valores obtidos para os óleos em estudo com o valor obtido para o ácido gálico, verifica-se que os óleos apresentam um poder antioxidante muito menor do que o do ácido gálico. Por outro lado, o ácido gálico apresenta uma cinética muito menos lenta que os óleos analisados. O facto de os óleos apresentarem este tipo de cinética é um aspecto positivo, uma vez que o efeito antioxidante se prolonga durante mais tempo [175].

5. Conclusões

5. Conclusões

Recorrendo à técnica de micro-extracção em fase sólida em modo de espaço-de-cabeça, combinada com a cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME/GC \times GC-ToFMS) determinou-se o perfil em compostos terpénicos (C₁₀ e C₁₅) das plantas secas de *E. globulus* L., *C. limon* L. e *H. androsaemum* L.. Foram, também, estudados os respectivos óleos obtidos por destilação por arrastamento de vapor relativamente à sua composição terpénica e actividade antioxidante.

Relativamente à composição terpénica em C₁₀ e C₁₅ foram identificados 246 compostos nas folhas secas das três plantas estudadas e 134 compostos nos respectivos óleos essenciais. Relativamente às plantas secas, no *E. globulus* L foram identificados 190 compostos, no *C. limon* L. 157 e no *H. androsaemum* L. 136. Nos óleos essenciais de *E. globulus* L., *C. limon* L e *H. androsaemum* L. identificaram-se 84, 35 e 48 compostos, respectivamente. A aplicação de uma técnica de elevada sensibilidade e resolução cromatográfica possibilitou o estudo detalhado da fracção terpénica em C₁₀ e C₁₅ e a identificação de novos compostos nestas espécies: 130 e 51 novos compostos na planta seca e respectivo óleo de *E. globulus* L., 100 e 9 no *C. limon* L. e 107 e 23 no *H. androsaemum* L.. Finalmente é de realçar o facto do perfil terpénico das 3 espécies em estudo ser particularmente enriquecido em compostos terpénicos em C₁₀ contendo oxigénio, uma vez que têm sido associados a este tipo de compostos vários efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente propriedades antimicrobianas [163].

No que diz respeito à actividade antioxidante dos óleos estudados o de *Citrus limon* L. foi o que apresentou um EC₅₀ mais baixo (2523 mg/L), ou seja, possui maior actividade antioxidante. Por sua vez o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. apresentou um EC₅₀ mais elevado (27100 mg/L). Verificou-se também que estes óleos essenciais apresentam uma cinética lenta o que é um aspecto positivo, uma vez que o efeito antioxidante se prolonga durante bastante tempo [175].

Os resultados obtidos através do estudo efectuado no presente trabalho abrem outras linhas de acção para trabalhos futuros no sentido de valorizar estas plantas como fonte potencial de compostos bioactivos com efeitos benéficos para a saúde humana.

Trabalho futuro:

Com vista a uma futura valorização das plantas como possíveis fontes de compostos bioactivos seria ainda relevante efectuar mais alguns estudos nomeadamente:

- Influência das condições de cultivo destas plantas, bem como dos tratamentos que estas sofrem antes e depois da sua colheita, na sua composição em compostos terpénicos (C₁₀ e C₁₅), actividade antioxidante e teor em compostos fenólicos. Sabe-se já que são diversos os factores que podem influenciar a composição das plantas (factores genéticos, estado de desenvolvimento da planta, clima, solo, condições de cultivo, pragas, etc). Os tratamentos que as plantas sofrem antes e depois da sua colheita (nomeadamente o uso de pesticidas, a trituração e as condições de armazenamento) também influenciam os compostos presentes nas plantas. Seria pois interessante analisar as mesmas espécies de plantas pertencentes a diferentes locais de colheita, controlando os outros factores, de modo a determinar quais as diferenças na composição terpénica, na actividade antioxidante e no teor em compostos fenólicos.
- Diferentes metodologias para obtenção de extractos enriquecidos em compostos terpénicos (designadamente extracção com fluido supercrítico) de modo a estabelecer qual a mais adequada a cada planta;
- Potenciais efeitos biológicos dos extractos obtidos e/ou de compostos isolados a partir destas espécies de plantas estudadas.

6. Referências bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. Terryn, N.; Van Montagu, M.; Inzé, D. e Goossens, A. "Functional genomic approaches to study and engineer secondary metabolism in plant cell cultures" (2006). Em *Medicinal and Aromatic Plants*. Bogers, R.J.; Craker, L.E. e Lange, D. (eds). Springer, Netherlands. pp. 291-300.
2. Gómez-Galera, S.; Pelacho, A.M.; Gené, A.; Capell, T. e Christou, P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Reports*, 2007. **26**: p. 1689-1715.
3. Rohloff, J. "Essential oil drugs – terpene composition of aromatic herbs" (2004). Em *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. Dris, R. e Jain, S.M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Vol. 3, pp. 73-128.
4. Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. Second Edition. 2002: John Wiley & Sons Ltd.
5. Lawless, J. *Die illustrierte Enzyklopädie der Aromaöle – Das umfassende Standardwerk der heilenden Öle und Pflanzen*. 1996. Bern: Scherz Verlag.
6. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. e Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008. **46** (2): p. 446-475.
7. Prosser, I.; Phillips, A.L.; Gittings, S.; Lewis, M.J.; Hooper, A.M.; Pickett, J.A. e Bealea, M.H. (+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. *Phytochemistry*, 2002. **60**: p. 691-702.
8. Zrira, S.; Bessiere, J.M.; Menut, C.; Elamrani, A. e Benjilali, B. Chemical composition of the essential oil of nine *Eucalyptus* species growing in Morocco. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004. **19** (2): p. 172-175.
9. Topal, U.; Sasaki, M.; Goto, M. e Otles, S. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2008. **59** (7-8): p. 619-634.
10. Bendaoud, H.; Bouajila, J.; Rhouma, A.; Savagnac, A. e Romdhane, M. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009. **89** (8): p. 1292-1297.
11. Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. e Angioni, A. Chemical variability, antifungal and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil from Sardinia. *Natural Product Communications*, 2010. **5** (2): p. 329-335.
12. Iqbal, Z.; Akhtar, M.; Qureshi, T.M.; Akhter, J. e Ahmad, R. Variation in composition and yield of foliage oil of *Eucalyptus Polybractea*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 2011. **33** (2): p. 183-187.

6. Referências bibliográficas

13. Silvestre, A.; Cavaleiro, J.; Delmond, B.; Filliatre, C. e Bourgeois, G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products* 1997. **6**: p. 27-33.
14. Della Porta, G.; Porcedda, S.; Marongiu, B. e Reverchon, E. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 1999. **14**: p. 214-218.
15. Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Hermans, N.; Totte, J.; Pieters, L. e Vlietinck, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002. **79** (2): p. 213-220.
16. Vekiari, S.A.; Protopapadakis, E.E.; Papadopoulou, P.; Papanicolaou, D.; Panou, C. e Vamvakias, M. Composition and Seasonal Variation of the Essential Oil from Leaves and Peel of a Cretan Lemon Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**: p. 147-153.
17. Kirbalsar, G. e Kirbaslar, S.I. Composition of Turkish bitter orange and lemon leaf oils. *Journal of Essential Oil Research*, 2004. **16** (2): p. 105-108.
18. Baik, J.S.; Kim, S.S.; Lee, J.A.; Oh, T.H.; Kim, J.Y.; Lee, N.H. e Hyun, C.G. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008. **18** (1): p. 74-79.
19. Smelcerovic, A.; Spiteller, M.; Ligon, A.P.; Smelcerovic, Z. e Raabe, N. Essential oil composition of *Hypericum* L. species from Southeastern Serbia and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007. **35** (2): p. 99-113.
20. Guedes, A.P.; Amorim, L.R.; Vicente, A.M.S.; Ramos, G. e Fernandes-Ferreira, M. Essential oils from plants and *in vitro* shoots of *Hypericum androsaemum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51**: p. 1399-1404.
21. Guedes, A.P.; Amorim, L.R.; Vicente, A. e Fernandes-Ferreira, M. Variation of the essential oil content and composition in leaves from cultivated plants of *Hypericum androsaemum* L. *Phytochemical Analysis*, 2004. **15**: p. 146-151.
22. Morteza-Semnani, K. e Saeedi, M. The essential oil composition of *Hypericum androsaemum* L. leaves and flowers from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 2005. **20** (3): p. 332-334.
23. Arthur, C.L. e Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 1990. **62**: p. 2145-2148.
24. Alpendurada, M.F. Solid-Phase Microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000. **889**: p. 3-14.

6. Referências bibliográficas

25. Augusto, F. e Valente, L. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002. **21**: p. 428-438.
26. Górecki, T.; Yu, X. e Pawliszyn, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *The Analyst*, 1999. **124**: p. 643-649.
27. Santos, M. Composição terpénica e actividade anti-oxidante de plantas e infusões. Tese de Mestrado. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2010.
28. Kataoka, H.; Lord, H. e Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis – Review. *Journal of Chromatography A*, 2000. **880**: p. 35-62.
29. Sigma-Aldrich Co. Supelco. 1998. Número do catálogo: 923. Solid-Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions.
30. Gonçalves, O. Pesquisa de compostos terpénicos do bagaço de *Vitis vinifera* L.. Estabelecimento de bases químicas e biológicas para o desenvolvimento de estratégias conducentes à sua valorização como produto de valor acrescentado. Tese de Mestrado. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2009.
31. Zhang, Z. e Pawliszyn, J. Headspace Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 1993. **65** (14): p. 1843-1852.
32. Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I. e Coimbra, M.A. Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49** (11): p. 5142-5151.
33. Petronilho, S.L. Caracterização da fracção sesquiterpénica de populações de camomila (*Matricaria recutita* L.). Tese de Mestrado. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2008.
34. Song, J.; Gardner, B.D.; Holland, J.F. e Beaudry, R.M. Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. **45**: p. 1801-1807.
35. Reis, S.; Rocha, S.; Barros, A.; Delgadillo, I. e Coimbra, M. Establishment of the volatile profile of ‘Bravo de Esmolfe’ apple variety and identification of varietal markers. *Food Chemistry*, 2009. **113** (2): p. 513-521.
36. Nunes, C.; Coimbra, M.A.; Saraiva, J. e Rocha, S.M. Study of the volatile components of a candied plum and estimation of their contribution to the aroma. *Food Chemistry*, 2008. **111** (4): p. 897-905.
37. Coelho, E.; Rocha, S.M.; Delgadillo, I. e Coimbra, M.A. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. ‘Baga’ ripening. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **563**: p. 204-214.

6. Referências bibliográficas

38. Rocha, S.; Coelho, E.; Zrostlíková, J.; Delgadillo, I. e Coimbra, M. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1161**: p. 292-299.
39. Kim, N.-S. e Lee, D.-S. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2003. **27** (1-2): p. 96-100.
40. Eyres, G.; Dufour, J.P.; Hallifax, G.; Sotheeswaran, S. e Marriott, P.J. Identification of character-impact odorants in coriander and wild coriander leaves using gas chromatography-olfactometry (GCO) and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOFMS). *Journal of Separation Science*, 2005. **28** (9-10): p. 1061-1074.
41. Araújo, H.C.; Lacerda, M.E.G.; Lopes, D.; Bizzo, H.R. e Kaplan, M.a.C. Studies on the aroma of Maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) using Headspace Solid-phase Microextraction. *Phytochemical Analysis*, 2007. **18** (6): p. 469-474.
42. Pan, L.; Chong, J.M. e Pawliszyn, J. Determination of amines in air and water using derivatization combined with solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1997. **773** (1-2): p. 249-260.
43. Jurado, J.M.; Ballesteros, O.; Alcázara, A.; Pablosa, F.; Martínez, M.J.; Vílchez, J.L. e Navalón, A. Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry and chemometrics *Talanta*, 2007. **72** (2): p. 506-511
44. Ravid, U.; Elkabetz, M.; Zamir, C.; Cohen, K.; Larkov, O. e Aly, R. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective GC-MS. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010. **25** (1): p. 20-27.
45. Jia, M.; Zhang, Q.H. e Min, D.B. Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. **46**: p. 2744-2747.
46. Abilleira, E.; De Renobales, M.; Nájera, A.I.; Virto, M.; Gordo, J.C.R.D.; Pérez-Elortondo, F.J.; Albisu, M. e Barron, L.J.R. An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2010. **120** (4): p. 1162-1169.
47. Silva, I.; Rocha, S.M.; Coimbra, M.A. e Marriott, P.J. Headspace solid-phase microextraction combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for the determination of volatile compounds from marine salt. *Journal of Chromatography A*, 2010. **127** (34): p. 5511-5521.

6. Referências bibliográficas

48. Abilleira, E.; Schlichtherle-Cerny, H.; Virto, M.; De Renobales, M. e Barron, L.J.R. Volatile composition and aroma-active compounds of farmhouse Idiazabal cheese made in winter and spring. *International Dairy Journal*, 2010. **20** (8): p. 537-544.
49. Tyagi, A.K. e Malik, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 2011. **126** (1): p. 228-235.
50. Flamini, G.; Cioni, P.L. e Morelli, I. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**: p. 4647-4652.
51. Fuselli, S.R.; De La Rosa, S.B.G.; Eguaras, M.J. e Fritz, R. Chemical composition and antimicrobial activity of Citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008. **24** (10): p. 2067-2072.
52. Bertsch, W. Two-dimensional gas chromatography: Concepts, instrumentation and applications – part 2: Comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, 2000. **23** (3): p. 167-181.
53. Górecki, T.; Panic, O. e Oldridge, N. Recent advances in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006. **29** (7-8): p. 1077-1104.
54. Dimandja, J.-M.D.; Stanfill, S.B.; Grainger, J. e Donald G. Patterson, J. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) to the qualitative analysis of essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, 2000. **23** (3): p. 208-214.
55. Shellie, R.; Marriott, P. e Cornwell, C. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) to the enantioselective analysis of essential oils. *Journal of Separation Science*, 2001. **24** (10-11): p. 823-830.
56. Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P. e Dugo, G. Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002. **970** (1-2): p. 225-234.
57. Di, X.; Shellie, R.A.; Marriott, P.J. e Huie, C.W. Application of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) for the chemical profiling of volatile oils in complex herbal mixtures. *Journal of Separation Science*, 2004. **27** (5-6): p. 451-458.
58. Özel, M.Z.; Göğüş, F. e Lewis, A.C. Comparison of direct thermal desorption with water distillation and superheated water extraction for the analysis of volatile components of *Rosa damascena* Mill. using GC x GC-TOF/MS. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **566** (2): p. 172-177.

6. Referências bibliográficas

59. Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P.Q.; Dugo, P. e Dugo, G. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2005. **20**: p. 136-140.
60. Von Mühlen, C.; Zini, C.; Caramão, E. e Marriott, P. Comparative study of *Eucalyptus dunnii* volatile oil composition using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight and quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1200**: p. 34-42.
61. Rajalakshmi, D. e Narasimhsan, S. "Food antioxidants: sources and methods of evaluation " (1996). Em *Food antioxidants : technological, toxicological and health perspectives*. Madhavi, D.L.; Deshpande, S.S. e Salunkhe, D.K. (eds). Marcel Dekker Inc, New York
62. Da Porto, C.; Calligaris, S.; Celotti, E. e Nicoli, M.C. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH[•] test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. **48** (9): p. 4241-4245.
63. Naczki, M. e Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1054** (1-2): p. 95-111.
64. Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S. e Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47** (10): p. 3954-3962.
65. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Bolwell, G.P.; Bramley, P.M. e Pridham, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 1995. **22** (4): p. 375-383.
66. Shahidi, F. e Naczki, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. 1995. Lancaster: CRC Press.
67. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004. **26**: p. 211-219.
68. Ghedira, K.; Goetz, P. e Jeune, R. *Eucalyptus globulus* Labill. *Phytothérapie*, 2008. **6** (3): p. 197-200.
69. Novais, M.H.; Santos, I.; Mendesa, S. e Pinto-Gomes, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. **93**: p. 183-195.
70. Maciel, M.V.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.L.; Silva, R.A.; Barros, R.S.; Sousa, R.N.; Sousa, L.C.; Brito, E.S. e Souza-Neto, M.A. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, 2010. **167** (1): p. 1-7.
71. Miyamoto, C.; Rocha De Sant'anna, J.; Silva Franco, C.; Cunico, M.; Miguel, O.; Côcco, L.; Yamamoto, C.; Corrêa Jr., C. e Castro-Prado, M. Genotoxic activity of

6. Referências bibliográficas

- Eucalyptus globulus* essential oil in *Aspergillus nidulans* diploid cells. *Folia Microbiologica*, 2009. **54** (6): p. 493-498.
72. Vilela, G.R.; De Almeida, G.S.; D'arce, M.a.B.R.; Moraes, M.H.D.; Brito, J.O.; Da Silva, M.F.D.G.F.; Silva, S.C.; De Stefano Piedade, S.M.; Calori-Domingues, M.A. e Da Gloria, E.M. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 2009. **45** (2): p. 108-111.
73. Salari, M.H.; Amine, G.; Shirazi, M.H.; Hafezi, R. e Mohammadypour, M. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. *Clinical Microbiology and Infection*, 2006. **12** (2): p. 194-196.
74. Gray, A. e Flatt, P. Antihyperglycemic actions of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) are associated with pancreatic and extrapancreatic effects in mice. *Journal of Nutrition*, 1998. **128**: p. 2319-2323.
75. Lis-Balchin, M.; Deans, S. e Eaglesham, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 1998. **13**: p. 98-104.
76. Almeida, I.F.; Fernandes, E.; Lima, J.; Valentao, P.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Costa, P.C. e Bahia, M.F. Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. *Journal of Medicinal Food*, 2009. **12** (1): p. 175-183.
77. Lee, K.-G. e Shibamoto, T. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001. **81**: p. 1573-1579.
78. Silva, J.; Abebe, W.; Sousa, S.M.; Duarte, V.G.; Machado, M.I.L. e Matos, E.T.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. **89** (2-3): p. 277-283.
79. Juergens, U.; Engelen, T.; Racke, K.; Stober, M.; Gillissen, A. e Vetter, H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2004. **17** (5): p. 281-287.
80. Koitabashi, R.; Suzuki, T.; Kawazu, T.; Sakai, A.; Kuroiwa, H. e Kuroiwa, T. 1,8-Cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*, 1997. **110**: p. 1-6.
81. Conde, E.; Cadahia, E. e Garcíavallejo, M.C. Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. *Phytochemical Analysis*, 1997. **8** (4): p. 186-193.

6. Referências bibliográficas

82. Atoui, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G. e Kefalas, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 2005. **89** (1): p. 27-36.
83. Proestos, C.; Kapsokafalou, M. e Komaitis, M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS after silylation. *Journal of Food Quality*, 2008. **31** (3): p. 402-414.
84. Camejo-Rodrigues, J.; Ascensão, L.; Bonet, M.À. e Vallès, J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. **89**: p. 199-209.
85. Lota, M.D.R.S., D.; Tomi, F.L.; Jacquemond, C. And Casanova, J. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50** (4): p. 796-805.
86. Crescimanno, F.G.; Depasquale, F.; Germana, M.A.; Bazan, E. e Palazzolo, E. Annual variation of essential oils in the leaves of 4 lemon *Citrus limon* (L.) Burm-F cultivars. Citriculture, Goren, R.; Mendal, K. e Goren, N. Vol. 1-4. 1989. Rehovot: Balaban Int Science Services. 583-588.
87. Njoroge, S.M.; Ukeda, H.; Kusunose, H. e Sawamura, M. Volatile components of japanese yuzu and lemon oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 1994. **9** (4): p. 159-166.
88. Del Rio, J.A.; Fuster, M.D.; Gomez, P.; Porras, I.; Garcia-Lidon, A. e Ortuno, A. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*, 2004. **84** (3): p. 457-461.
89. Fisher, K. e Phillips, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 2006. **101** (6): p. 1232-1240.
90. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J. e Pérez-Álvarez, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 2008. **19** (12): p. 1130-1138.
91. Setzer, W.N. Essential oils and anxiolytic aromatherapy. *Natural Product Communications*, 2009. **4** (9): p. 1305-1316.
92. González-Molina, E.; Domínguez-Perles, R.; Moreno, D.A. e García-Viguera, C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010. **51**: p. 327-345.
93. Arias, B. e Ramonlaca, L. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. **97** (1): p. 89-95.

6. Referências bibliográficas

94. Moufida, S. e Marzouk, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 2003. **62**: p. 1283-1289.
95. Aazza, S.; Lyoussi, B. e Miguel, M.G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 2011. **16** (9): p. 7672-7690.
96. Choi, H.S.; Song, H.S.; Ukeda, H. e Sawamura, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. **48** (9): p. 4156-4161.
97. Frassinetti, S.; Caltavuturo, L.; Cini, M.; Della Croce, C.M. e Maserti, B.E. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 2011. **23** (1): p. 27-31.
98. Zellweger, M.J.; Osterwalder, R.H.; Langewitz, W. e Pfisterera, M.E. Coronary artery disease and depression. *European Heart Journal*, 2004. **25**: p. 3-9.
99. Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.; Seabra, R. e Bastos, M. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002. **25** (10): p. 1320-1323.
100. Ozen, T.; Ayan, A.K.; Cirak, C. e Kevseroglu, K. Total phenol content of some *Hypericum* species growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 2005. **41** (2): p. 232-233.
101. Hernandez, M.F.; Fale, P.L.V.; Araujo, M.E.M. e Serralheiro, M.L.M. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. *Food Chemistry*, 2010. **120** (4): p. 1076-1082.
102. Rainha, N.; Lima, E. e Baptista, J. Comparison of the endemic Azorean *Hypericum foliosum* with other *Hypericum* species: antioxidant activity and phenolic profile. *Natural Product Research*, 2011. **25** (2): p. 123-135.
103. Dopico-Garcia, M.S.; Castro-Lopez, M.M.; Lopez-Vilarino, J.M.; Gonzalez-Rodriguez, M.V.; Valentao, P.; Andrade, P.B.; Garcia-Garabal, S. e Abad, M.J. Natural Extracts as Potential Source of Antioxidants to Stabilize Polyolefins. *Journal of Applied Polymer Science*, 2011. **119** (6): p. 3553-3559.
104. Dias, A.C.P.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B. e Fernandes-Ferreira, M. The development and evaluation of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from in vivo and in vitro biomass of *Hypericum* species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1999. **22** (2): p. 215-227.
105. Laporta, M.Z. e Silva, P.R.S.D. Curso: ciências biológicas. Microbiologia, atividades práticas. 4º ano. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Centro Universitário Fundação Santo André, 2006.

6. Referências bibliográficas

106. Aruoma, O.I.; Murcia, A.; Butler, J. e Halliwell, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993. **41** (11): p. 1880-1885.
107. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 1995. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
108. Cardeal, Z.L.; Da Silva, M. e Marriott, P.J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20** (19): p. 2823-2836.
109. Xu, X.; Stee, L.L.P.V.; Williams, J.; Beens, J.; Adahchour, M.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.a.T. e Lelieveld, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2003. **3**: p. 1139–1181.
110. Da Silva, M.H.L.; Andrade, E.H.A.; Zoghbi, M.G.B.; Luz, A.I.R.; Da Silva, J.D. e Maia, J.G.S. The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 1999. **14**: p. 208-210.
111. Araujo, E.C.C.; Silveira, E.R.; Lima, M.a.S.; Neto, M.A.; De Andrade, I.L.; Lima, M.a.A.; Santiago, G.M.P. e Mesquita, A.L.M. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51** (13): p. 3760-3762.
112. Rychlik, M.; Schieberle, P. e Grosch, W. In compilation of odour thresholds, odour qualities and retention indices of key food odorants. *Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München*, 1998. p.
113. Čajka, T.; Hajšlová, J.; Cochran, J.; Holadová, K. e Klimánková, E. Solid phase microextraction–comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *Journal of Separation Science*, 2007. **30** (4): p. 534-546.
114. Kartal, N.; Sokmen, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M. e Sokmen, A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 2007. **100**: p. 584-589.
115. Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H. e Jean, F.-I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 1995. **38** (2): p. 381-389.
116. Frizzo, C.D.; Serafini, L.A.; Dellacassa, E.; Lorenzo, D. e Moyna, P. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 2001. **16**: p. 286-288.

6. Referências bibliográficas

117. Silou, T.; Loubaki, L.; Figuéredo, G. e Chalchat, J.-C. Study of essential oil composition of *Elyonurus hensii* Schum from Congo. *Journal of Essential Oil Research*, 2006. **18**: p. 518-520.
118. Högnadóttir, A. e Rouseff, R.L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatographymass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003. **998** (1-2): p. 201-211.
119. Campeol, E.; Flamini, G.; Chericoni, S. e Catalano, S. Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**: p. 5409-5411.
120. Staniek, A.; Muntendam, R.; Woerdenbag, H.J. e Kayser, O. Essential oil constituents derived from different organs of a relictual conifer *Wollemia nobilis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010. **38** (2): p. 131-135.
121. Adams, R.P.; Elizondo, M.S.G.; Elizondo, M.G. e Slinkman, E. DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006. **34** (3): p. 205-211.
122. Avato, P.; Raffo, F.; Aldouri, N.A. e Vartanian, S.T. Essential oils of *Varthemia iphionoides* from Jordan. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004. **19**: p. 559-561.
123. Adams, R.P. The serrate leaf margined *Juniperus* (Section *Sabina*) of the western hemisphere: systematics and evolution based on leaf essential oils and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000. **28**: p. 975-989.
124. Leffingwell, J.C. e Alford, E.D. Volatile constituents of *Perique tobacco*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **4**: p. 899-915.
125. Bilia, A.R.; Flamini, G.; Taglioli, V.; Morelli, I. e Vincieri, F.F. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chemistry*, 2002. **76** (3): p. 307-310.
126. Karioti, A.; Skaltsa, H.; Demetzos, C.; Perdetzoglou, D.; Economakis, C.D. e Salem, A.B. Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill. in solution culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51** (22): p. 6505-6508.
127. Gauvin, A.; Lecomte, H. e Smadja, J. Comparative investigations of the essential oils of two scented geranium (*Pelargonium* spp.) cultivars grown on Reunion Island. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004. **19** (5): p. 455-460.
128. Adams, R.P. Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000. **28**: p. 515-528.

6. Referências bibliográficas

129. Siani, A.C.; Garrido, I.S.; Monteiro, S.S.; Carvalho, E.S. e Ramos, M.F.S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004. **32**: p. 477-489.
130. Lalel, H.J.D.; Singh, Z. e Chye Tan, S. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity. *Postharvest Biology and Technology*, 2003. **29**: p. 205-218.
131. Oliveira, A.L.; Lopes, R.B.; Cabral, F.A. e Eberlin, M.N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, 2006. **99**: p. 1-5.
132. Viña, A. e Murillo, E. Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp) grown in Columbia. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2003. **14** (5): p. 744-749.
133. Blázquez, M.A.; Pérez, I. e Boira, H. Essential oil analysis of *Teucrium libanitis* and *T. turredanum* by GC and GC-MS. 2003. **18** (6): p. 501.
134. Baranauskiene, R.; Venskutonis, R.P. e Demyttenaere, J.C.R. Sensory and instrumental evaluation of catnip (*Nepeta cataria* L.) aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51** (13): p. 3840-3848.
135. De Marchese, M.J.A.; De Heluani, C.S.; Catalan, C.a.N.; Griffin, C.A.; Vaughn, J.B.J. e Herz, W. Incisol, an alcohol with a novel sesquiterpene skeleton from *Xenophyllum incisum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007. **35**: p. 676-681.
136. Priestap, H.A.; Van Baren, C.M.; Di Leo Lira, P.; Coussio, J.D. e Bandoni, A.L. Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry*, 2003. **63** (2): p. 221-225.
137. Petronilho, S.; Maraschin, M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A. e Rocha, S.M. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Industrial Crops and Products*, 2011. **34** (3): p. 1482-1490.
138. Lucero, M.E.; Fredrickson, E.L.; Estell, R.E.; Morrison, A.A. e Richman, D.B. Volatile composition of *Gutierrezia sarothrae* (Broom snakeweed) as determined by steam distillation and solid phase microextraction. *Journal of Essential Oil Research*, 2006. **18** (2): p. 121-125.
139. Buchin, S.; Salmon, J.-C.; Carnat, A.-P.; Berger, T.; Bugaud, C. e Bosset, J.O. Identification de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et benzéniques dans un lait d'alpage très riche en ces substances. *Mitt Lebensmittelunters Hyg*, 2002. **93**: p. 199-216.
140. Gioacchini, A.M.; De Santi, M.; Guescini, M.; Brandi, G. e Stocchi, V. Characterization of the volatile organic compounds of Italian 'Fossa' cheese by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010. **24** (23): p. 3405-3412.

6. Referências bibliográficas

141. Skaltsa, H.D.; Demetzos, C.; Lazari, D. e Sokovic, M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 2003. **64** (3): p. 743-752.
142. Konig, W.A.; Joulain, D. e Hochmuth, D.H. "GC/MS Library: terpenoids and related constituents of essential oils" (2004). Em *Convenient and Rapid Analysis of GC-MS*. Hochmuth, D.H. (eds). Hamburg, Germany.
143. Urzúa, A.; Santander, R. e Echeverría, J. Analysis of surface and volatile compounds of flower heads of *Flourensia thurifera* (mol) D.C. *Journal Of The Chilean Chemical Society*, 2007. **52** (3): p. 1244-1245.
144. Everaerts, C.; Roisin, Y.; Lequere, J.L.; Bonnard, O. e Pasteels, J.M. Sesquiterpenes in the frontal gland secretions of nasute soldier termites from New Guinea. *Journal of Chemical Ecology*, 1993. **19** (12): p. 2865-2879.
145. Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagau, F. e Legault, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006. **103** (1): p. 99-102.
146. Tellez, M.R.; Canel, C.; Rimando, A.M. e Duke, S.O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 1999. **52** (6): p. 1035-1040.
147. Asuming, W.A.; Beauchamp, P.S.; Descalzo, J.T.; Dev, B.C.; Dev, V.; Frost, S. e Ma, C.W. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2005. **33** (1): p. 17-26.
148. Tayoub, G.; Schwob, I.; Bessiere, J.M.; Masotti, V.; Rabier, J.; Ruzzier, M. e Viano, J. Composition of volatile oils of *Styrax* (*Styrax officinalis* L.) leaves at different phenological stages. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006. **34** (9): p. 705-709.
149. Tzakou, O. e Couladis, M. The essential oil of *Micromeria graeca* (L.) Benth et Reichenb. growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 2001. **16** (2): p. 107-109.
150. Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Faleiro, M.L. e Miguel, M.G. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. **54** (17): p. 6314-6321.
151. Dzamic, A.; Gbolade, A.; Ristic, M. e Marin, P. Essential oil composition of *Anacardium occidentale* from Nigeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 2009. **45** (3): p. 441-442.
152. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Shafi, P.M.; Rosarnna, M.K. e Geissler, M. Analysis of the composition and aroma of the essential leaf oil of *Syzygium travancoricum* from South India by GC-FID, GC-MS, and Olfactometry. Seasonal changes of composition. *Chromatographia Supplement*, 2001. **53**: p. 372-374.

6. Referências bibliográficas

153. Jelen, H.H. Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50** (22): p. 6569-6574.
154. Boland, D.J.; Brophy, J.J. e House, A.P.N. Eucalyptus leaf oils : use, chemistry, distillation and marketing. 1991. Melbourne, Sydney: Inkatta Press.
155. Viturro, C.I.; Molina, A.C. e Heit, C.I. Volatile components of *Eucalyptus globulus* Labill ssp *bicostata* from Jujuy, Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 2003. **15** (3): p. 206-208.
156. Astani, A.; Reichling, J. e Schnitzler, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research*, 2010. **24** (5): p. 673-679.
157. Belletti, N.; Kamdem, S.; Tabanelli, G.; Lanciotti, R. e Gardini, F. Modeling of combined effects of citral, linalool and β -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 2010. **136**: p. 283-289.
158. Guimaraes, L.G.D.; Cardoso, M.D.; De Sousa, P.E.; De Andrade, J. e Vieira, S.S. Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. *Revista Ciencia Agronomica*, 2011. **42** (2): p. 464-472.
159. Martin, S.; Padilla, E.; Ocete, M.; Galvez, J.; Jiménez, J. e Zarzuelo, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. *Planta Med.*, 1993. **59** (6): p. 533-536.
160. Da Silva, S.L.; Figueiredo, P.M.S. e Yano, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *European Journal of Pharmacology*, 2007. **576** (1-3): p. 180-188.
161. Tambe, Y.; Tsujiuchi, H.; Honda, G.; Ikeshiro, Y. e Tanaka, S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, beta-caryophyllene. *Planta Medica*, 1996. **62** (5): p. 469-470.
162. Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Mannelli, L.D.; Mazzanti, G. e Bartolini, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. *Farmaco*, 2001. **56** (5-7): p. 387-389.
163. Naigre, R.; Kalck, P.; Rogues, C.; Roux, I. e Michel, G. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Medica*, 1996. **62** (3): p. 275-277.
164. Haraguchi, H.; Ishikawa, H.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Kubo, Y. e Kubo, I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1997. **5** (5): p. 865-871.
165. Brehm-Stecher, B.F. e Johnson, E.A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoid nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2003. **47** (10): p. 3357-3360.

6. Referências bibliográficas

166. Xu, Z.H.; Chang, F.R.; Wang, H.K.; Kashiwada, Y.; Mcphail, A.T.; Bastow, K.F.; Tachibana, Y.; Cosentino, M. e Lee, K.H. Anti-HIV agents 45 and antitumor agents 205. Two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. *Journal of Natural Products*, 2000. **63** (12): p. 1712-1715.
167. Lim, C.S.; Jin, D.Q.; Mok, H.; Oh, S.J.; Lee, J.U.; Hwang, J.K.; Ha, I. e Han, J.S. Antioxidant and antiinflammatory activities of xanthorrhizol in hippocampal neurons and primary cultured microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 2005. **82** (6): p. 831-838.
168. Essenberg, M.; Grover, P.B. e Cover, E.C. Accumulation of antibacterial sesquiterpenoids in bacterially inoculated gossypium leaves and cotyledons. *Phytochemistry*, 1990. **29** (10): p. 3107-3113.
169. Tamemoto, K., Takaishi, Y., Chen, B., Kawazoe, K., Shibata, H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K. e Ashurmetov, O. Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry*, 2001. **58** (5): p. 763-767.
170. Simões, M.; Rocha, S.; Coimbra, M.A. e Vieira, M.J. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Antibiotic Susceptibility Using Sesquiterpenoids. *Medicinal Chemistry*, 2008. **4** (6): p. 616-623.
171. Gonçalves, O.; Pereira, R.; Gonçalves, F.; Mendo, S.; Coimbra, M.A. e Rocha, S.M. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and of their influence on antibiotic susceptibility of two clinically relevant bacteria. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011. p.
172. Tatman, D. e Mo, H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Letters*, 2002. **175**: p. 129-139.
173. Ahmed, A.F.; Su, J.H.; Shiue, R.T.; Pan, X.J.; Dai, C.F.; Kuo, Y.H. e Sheu, J.H. New beta-caryophyllene-derived terpenoids from the soft coral *Sinularia nanolobata*. *Journal of Natural Products*, 2004. **67** (4): p. 592-597.
174. Allouche, N.; Apel, C.; Martin, M.T.; Dumontet, V.; Gueritte, F. e Litaudon, M. Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry*, 2009. **70** (4): p. 546-553.
175. Silva, A.R.; Menezes, P.F.C.; Martinello, T.; Novakovich, G.F.L.; Praes, C.E.O. e Feferman, I.H.S. Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. *International Journal of Cosmetic Science*, 2010. **32** (1): p. 73-80.